

Université de Montréal

**Dualité d'action de la galectine-3  
dans la pathophysiologie de l'arthrose**

Par

Audrée Janelle-Montcalm

Département de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention d'une maîtrise  
en sciences biomédicales

Février 2007

© Audrée Janelle-Montcalm, 2007



W

M

U58

2007

V.130

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Dualité d'action de la galectine-3  
dans la pathophysiologie de l'arthrose**

Présenté par :

Audrée Janelle-Montcalm

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Muhammad Zafarullah

Pascal Reboul

Mohamed Benderdour

## Résumé

L'arthrose (OA) est une maladie multifactorielle dans laquelle chacun des différents tissus de l'articulation joue un rôle. La membrane synoviale, le cartilage et l'os sous-chondral communiquent les uns avec les autres lors du développement de la pathologie. Plusieurs protéines voient leur expression modifiée dans les tissus OA. Ohshima *et al.* (2003) ont identifié la galectine-3 (gal-3) chez les patients OA au niveau du pannus, qui est une hyperplasie de la membrane synoviale prenant place sur le cartilage et l'os. De plus, les macrophages présents dans le pannus ont la capacité de sécréter de grandes quantités de gal-3.

Comme le rôle de la gal-3 dans le développement de l'arthrose est encore inconnu, ce projet de recherche visait donc à découvrir l'importance de cette protéine dans les tissus OA. Nous avons démontré que, *in vivo*, la gal-3 extracellulaire induit une dégénération des tissus de l'articulation. Ensuite, la stimulation de chondrocytes OA avec gal-3 a augmenté l'expression d'ADAMTS-5 et de MMP-3, deux enzymes jouant un rôle clé dans la dégradation de la matrice cartilagineuse de l'articulation.

Des ostéoblastes issus de l'os sous-chondral OA incubés avec gal-3 ont démontré une modification de leur phénotype caractérisé par une baisse de leur expression d'ostéocalcine, suggérant une dédifférentiation des ostéoblastes. Une augmentation de l'expression de RANKL, un facteur favorisant la résorption osseuse, par les ostéoblastes suite à une stimulation avec gal-3 fut observée, tout comme une augmentation de l'expression d'OPG, impliqué dans l'arrêt de la résorption osseuse. Comme un ratio RANKL/OPG positif est un indicateur de la résorption osseuse et que l'augmentation de l'expression de RANKL et d'OPG par gal-3 augmente ce ratio, il semblerait que gal-3 favorise la résorption osseuse. La dimérisation de gal-3 est essentielle dans l'initiation de la réponse des ostéoblastes.

Ces résultats suggèrent donc que la gal-3, présente au niveau du pannus lors de l'OA, pourrait favoriser la dégénération des tissus de l'articulation.

Mots clés :

- arthrose
- ostéoblaste
- OPG
- ADAMTS-5
- RANKL
- chondrocyte
- galectine-3
- ostéocalcine
- MMP-3

### **Abstract**

Osteoarthritis (OA) is a multifactorial disease in which the various tissues of the articulation all play a role. The synovium, the cartilage and the subchondral bone communicate together during the establishment of the pathology. The expression level of several proteins is modified in OA. Ohshima et al. (2003) identified galectin-3 (gal-3) at the level of the pannus, an hyperplasia of the synovium touching bone and cartilage, in OA patients. Moreover, macrophages found at the pannus can secrete great quantities of gal-3.

Since the role of gal-3 in the etiology of OA is still unknown, this research project aimed at clarifying the role of this protein in OA tissues. We demonstrated *in vivo* that extracellular gal-3 induces a degradation of articular tissues. Subsequently, we showed that OA chondrocytes stimulated with gal-3 expressed ADAMTS-5 and MMP-3, two important enzymes in cartilage catabolism, at a level higher than normal.

OA subchondral osteoblasts incubated with gal-3 presented lower osteocalcin expression, suggesting a dedifferentiation of those osteoblasts. An increase in the expression of RANKL, a factor involved in bone resorption, following incubation with gal-3 was noted, as was an increase in the expression of OPG, which plays a role in the arrest of bone resorption. Since a positive RANKL/OPG ratio indicates bone resorption and that the expression of RANKL and OPG following incubation with gal-3 raised this ratio, gal-3 might induce bone resorption. In addition, gal-3 dimerization is necessary for the initiation of an effect in osteoblasts by this extracellular protein.

These results suggest that gal-3, found at the level of the pannus in OA, might induce degeneration of the articular structures.

**KEY WORDS:**

- osteoarthritis	- chondrocyte
- osteoblast	- galectin-3
- OPG	- osteocalcin
- ADAMTS-5	- MMP-3
- RANKL	



## **TABLE DES MATIÈRES**

<b>Composition du jury</b>	.....ii
<b>Résumé français</b>	.....iii
<b>Résumé anglais</b>	.....v
<b>Table des matières</b>	.....vii
<b>Liste des tableaux</b>	.....ix
<b>Liste des figures</b>	.....x
<b>Liste des abréviations</b>	.....xi
<b>Remerciments</b>	.....xii

## **Introduction**

<b>1. Arthrose (OA)</b>	.....1
1.1. Aperçu de l'OA et du rhumatisme au Canada	.....1
1.2. Symptômes et diagnostic	.....2
1.3. Facteurs de risques	.....3
1.4. Structure de l'articulation	.....5
1.5. Cartilage	.....6
1.6. Os	.....8
1.7. Membrane synoviale	.....12
1.8. Portrait de la pathologie	.....13
1.9. Inflammation	.....18
1.10. Traitement	.....19

2. Galectines	20
3. Galectine-3 (Gal-3)	21
3.1. Distribution et structure	21
3.2. Gal-3 intracellulaire	23
3.3. Gal-3 extracellulaire	28
3.4. Régulation et expression de gal-3	31
<b>Hypothèses</b>	33
<b>Méthodologie</b>	34
<b>Résultats</b>	44
<i>Article (l'article fut inséré entre les pages 54 et 55)</i>	
<b>Discussion</b>	55
<b>Perspectives</b>	60
<b>Conclusion</b>	61
<b>Références</b>	62
<b>Déclaration de l'étudiante</b>	77

**Liste des tableaux**

<b>Table 1 : Ligands de la gal-3</b>	.....28
--------------------------------------	---------

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Structure d'une articulation</b>	<b>.....6</b>
<b>Figure 2 : Régulation de l'activité des ostéoclastes par RANK/RANKL/OPG</b>	<b>.....10</b>
<b>Figure 3 : Modifications de l'articulation lors de l'OA</b>	<b>.....13</b>
<b>Figure 4 : Structure de gal-3 et du CRD</b>	<b>.....22</b>
<b>Figure 5 : Présence de la gal-3 lors de l'arthrite rhumatoïde (RA)</b>	<b>.....31</b>
<b>Figure 6 : Amplification du CRD à partir du vecteur pTcrHisA gal-3</b>	<b>.....44</b>
<b>Figure 7 : Digestion du vecteur pTcrHis A et du CRD avec BamH1 et EcoR1</b>	<b>.....44</b>
<b>Figure 8 : Dépistage des clones exprimant pTcrHis A CRD</b>	<b>.....45</b>
<b>Figure 9 : Comparaison des concentrations d'ADN</b>	<b>.....45</b>
<b>Figure 10 : Digestion de l'ADN du clone 9</b>	<b>.....46</b>
<b>Figure 11 : Essais de pontage avec BS<sup>3</sup> de la gale-3 et du CRD</b>	<b>.....47</b>
<b>Figure 12 : Digestion de CRD avec EK-Max</b>	<b>.....48</b>
<b>Figure 13: Expression d'ostéoprotégérine par des ostéoblastes traités avec gal-3</b>	<b>.....49</b>
<b>Figure 14: Expression de RANKL par des ostéoblastes traités avec gal-3</b>	<b>.....50</b>
<b>Figure 15 : Stimulation des ostéoblastes OA avec dCRD</b>	<b>.....52</b>
<b>Figure 16:: Stimulation d'ostéoblastes avec LPS</b>	<b>.....53</b>

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AGEs : produits de glycation avancés

ADAMTS : Une disintégrine et métalloprotéinase avec motif thrombospondine

AINS : anti-inflammatoires non-stéroïdiens

AP : phosphatase alcaline

BMP : protéine osseuse morphogénique

BSP : sialoprotéine osseuse

CDK : kinase cycline-dépendante

COX : cyclooxygénases

CRD : domaine de reconnaissance des glucides (*carbohydrate recognition domain*)

dCRD : CRD sans séquence His-Tag

EGF : facteur de croissance endothélial

FGF : facteur de croissance des fibroblastes

Gal-3 : galectine-3

GDP : guanosine-biphosphate

GTP : guanosine-triphosphate

IGF : facteur de croissance insulomimétique

HIPK2 : homeodomain-interacting protein kinase

IL : interleukine

LGALS3 : lectine, liant les galactosides, soluble 3

Mac-2 : protéine marqueur de macrophage 2

MIP-1 : protéine inflammatoire du macrophage-1

MMP : métalloprotéases matricielles

MT1-MMP : métalloprotéase matricielle membranaire de type 1

NES : séquence d'export nucléaire

OA : arthrose

OC : ostéocalcine

OPG : ostéoprotégérine

PCR : réaction en chaîne par la polymérase

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase

PRELP: protéine riche en arginine qui se termine par une région riche en leucine

PTH : hormone parathyroïdienne

RANK : récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B

RANKL : ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B

ROS : espèces d'oxygène réactives

TGF : facteur de croissance tumoral

TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéases

TNF- $\alpha$  : facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$

UV : ultraviolet

VitD<sub>3</sub> : vitamine D<sub>3</sub>

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, un grand merci au Dr. Pascal Reboul pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire et d'avoir partagé avec moi sa grande sagesse en m'incitant à travailler mes compétences transversales. Je souhaite souligner aussi le rôle important de Mélanie Guévremont, qui m'a aidé beaucoup dans l'apprentissage de techniques et qui partagea avec moi son expérience. Je tiens aussi à remercier Maxime Dussault-Laurendeau pour avoir fait les expériences de multimérisation de gal-3 et du CRD; de plus, je n'ai pu qu'admirer l'ordre et la méthode de Maxime lors de ses 2 stages au laboratoire.

Je désire aussi remercier tous les membres de l'unité de recherche en arthrose, plus particulièrement Dr. Marter-Pelletier et Dr. Pelletier, les deux dirigeants de l'unité. En créant l'unité de recherche en arthrose, ils ont su créer un environnement de travail stimulant et agréable. Un merci particulier au Dr. Christelle Boileau et à Mr. Martin Boily pour m'avoir enseigné les techniques d'immunohistochimie et à Mr. François Mineau, pour l'étendue de son savoir. Je tiens aussi à souligner l'implication du Dr. Denis Couchourel et de Mme Aline Delalandre, qui m'ont aidé à approfondir mes connaissances en humour français.

## **INTRODUCTION**

### **1. Arthrose (OA)**

#### **1.1. Aperçu de l'OA et du rhumatisme au Canada**

L'enquête sur la santé des collectivités canadiennes (ESCC) publiée par Statistique Canada en 2000 a démontré que près de 16% des canadiens, soit environ 4 millions, étaient atteints d'OA et de rhumatismes. Parmi les sujets atteints d'OA, la majorité avait entre 45 et 75 ans. Les femmes formaient le deux tiers de ce groupe, et la prévalence de l'OA chez les femmes était plus élevée que chez les hommes, soit respectivement 19 et 11%. La prévalence de la maladie varie d'une province à l'autre, et on dénote que le Québec présente la plus faible prévalence au pays, soit 11,5%, alors que la moyenne canadienne se situe à 15,2%. En réponse au vieillissement de la population, il est estimé que la prévalence de l'OA augmentera de près de 1% par année, et ce pour dépasser le cap des 20% d'ici 2026. L'étude menée par Statistique Canada a aussi évalué la qualité de vie des personnes souffrant d'OA. En comparant les patients souffrant d'OA avec d'autres patients présentant des problèmes de santé chroniques, les personnes atteintes d'OA étaient plus nombreuses à indiquer qu'elles avaient dû diminuer leurs activités et se reposer dans les 2 semaines précédant l'enquête. De plus, parmi tous les groupes d'âge, les répondants atteints d'OA étaient ceux qui avaient le plus besoin d'aide à domicile lorsque comparés aux autres répondants souffrant de problèmes de santé chroniques. La différence entre ces deux groupes était de 15% chez les patients jeunes et de 20% chez les patients plus âgés. Les patients atteints d'OA présentent aussi plus de douleur que les autres patients souffrant de maladies chroniques; en effet, les répondants atteints d'OA sont sujets à des douleurs d'intensité moyenne à forte à une proportion 3 fois plus élevée que celle retrouvée chez l'autre groupe. En plus de causer des douleurs, l'OA peut aussi troubler le sommeil; ainsi, parmi tous les groupes d'âge, les répondants atteints d'OA sont ceux qui présentent la plus forte proportion d'individus indiquant qu'ils dorment moins de 6 heures par nuit. Tous ces effets sur la vie quotidienne perturbent les patients, ce qui se reflète sur leur psychique. Par conséquent, parmi tous les groupes d'âge, les patients souffrant d'OA sont plus nombreux à présenter des signes de dépression. Finalement, les patients atteints d'OA ont été plus nombreux que les personnes saines ou souffrants d'affectations chroniques à consulter un



médecin de première ligne (omnipraticien ou médecin de famille) au moins quatre fois au cours de l'année précédant l'enquête. En conclusion, l'OA affecte une bonne partie de la population canadienne et réduit grandement la qualité de vie. Cette pathologie affecte aussi grandement le système de santé. Comme la prévalence de la maladie devrait augmenter au cours des prochaines années, la maladie deviendra un fardeau plus important pour ce dernier. Il est donc important de continuer la recherche sur l'OA, en espérant que des découvertes pourront améliorer la qualité de vie des nombreuses personnes atteintes de cette pathologie.

## **1.2. Symptômes et diagnostic**

Les principales articulations touchées lors de l'OA sont : le genou, la hanche, les articulations interphalangiennes distales et proximales des doigts, la première articulation carpométacarpienne de la main, les articulations apophysaires cervicales et lombaires de la colonne vertébrale et la première articulation métatarso-phalangienne du pied (*Klippel et al., 2001*). Les différentes démonstrations cliniques de l'OA sont variables d'un patient à l'autre, mais on peut dénoter un ou plusieurs de ces points chez les patients présentant la pathologie. La principale caractéristique de l'OA est la présence de douleur au niveau des articulations touchées. En général, cette douleur est déclanchée par le mouvement des articulations. Au fur et à mesure que la maladie progresse, la douleur peut devenir chronique et une douleur intense peut se présenter par épisodes. De plus, une raideur articulaire se fait sentir au réveil ou après le repos. La douleur et la raideur articulaire peuvent s'atténuer lorsque le patient est au repos. Par contre, chez les patients présentant un stade OA avancé, la douleur chronique peut se faire sentir au repos et n'est nullement diminuée suite à une réduction des mouvements (*Hunter et Felson, 2006*). Généralement, les articulations présentent une réduction de l'ampleur de leurs mouvements, ce qui est parfois une conséquence secondaire du développement des ostéophytes. Ceux-ci sont des protubérances chondro-osseuses provenant du périoste situé à la jonction de l'os et du cartilage et recouvertes de fibrocartilage. Les articulations endommagées produisent aussi des crépitements chez certains patients atteints d'OA. Finalement, la région adjacente à l'articulation peut présenter un gonflement suite à une effusion du fluide synovial, qui s'accumule parfois dans les articulations OA (*Haq et al., 2003*). Il est important de noter

que l'un des principaux moyens de diagnostic pour l'OA est la radiographie des articulations affectées, où la sévérité de l'OA se base sur la réduction de l'espace articulaire. En fait, la réduction de l'espace articulaire est un indice de dégradation du cartilage. Ainsi, une dégradation graduelle du cartilage réduit l'épaisseur de celui-ci et rapproche donc les os de l'articulation l'un de l'autre, ce qui est visible par une réduction de l'espace articulaire. Par contre, il a été noté que la présence de douleur et les altérations de la fonction de l'articulation ne corrélaient pas toujours avec la réduction de l'espace articulaire (*Davis et al., 1992*). Dans un tel cas, l'utilisation de la réduction de l'espace articulaire pour diagnostiquer l'OA reste à débattre; conséquemment, l'identification de marqueurs spécifiques à l'OA (fragments de collagène, d'aggrécane ou autre) permettrait peut-être d'effectuer un diagnostic plus efficace. Les marqueurs isolés à partir du sérum, du fluide synovial ou de l'urine permettraient d'obtenir une technique plus sensible et pourrait permettre d'obtenir un diagnostic d'OA plus tôt que ne le permet la radiographie, en plus d'être plus fiable. Toutefois, l'identification de tels marqueurs reste à confirmer (*Punzi et al, 2005*).

### **1.3. Facteurs de risques**

Différents facteurs physiques et environnementaux peuvent favoriser le développement de l'OA. Les anomalies structurales de l'articulation, tel les déformations et les mauvais alignements des os, rendent les articulations plus vulnérables à l'OA. Par exemple, certaines déformations prenant place lors du développement, comme la dislocation congénitale, impliquant une subluxation de la hanche, une dislocation de la hanche et dysplasie de l'acétabulum, et la maladie Legg-Perthes, où une nécrose prend place dans la tête fémorale suite à un mauvais apport sanguin lors de l'ossification endochondrale, amènent le patient à développer de l'OA. De plus, des blessures majeures aux articulations augmentent le risque de développer de l'OA plus tard dans la vie du patient. Également, les athlètes pratiquant des sports tel que le soccer, le football et la course à un niveau avancé et compétitif sont plus à risque de développer de l'OA que des gens ne pratiquant pas ces activités (*Lane et Buckwalter, 1993*). Dans le cas des blessures et de la pratique de sports de haut niveau, une des hypothèses est que les dommages encourus par le cartilage altèrent ses propriétés et le fragilisent, ce qui favorise ainsi l'évolution de l'OA. Les activités

quotidiennes comme le travail influence aussi le développement de l'OA. Il a été démontré que les agriculteurs sont à plus haut risque de développer de l'OA de la hanche que les travailleurs plus sédentaires. Certains mouvements faits de façon répétitive lors du travail favorisent l'initiation de l'OA dans les articulations impliquées dans ce mouvement; en effet, les poseurs de tapis, qui doivent se mettre à genoux régulièrement, sont plus à risque de développer de l'OA au niveau des genoux (*Kimivaji et al, 1992*).

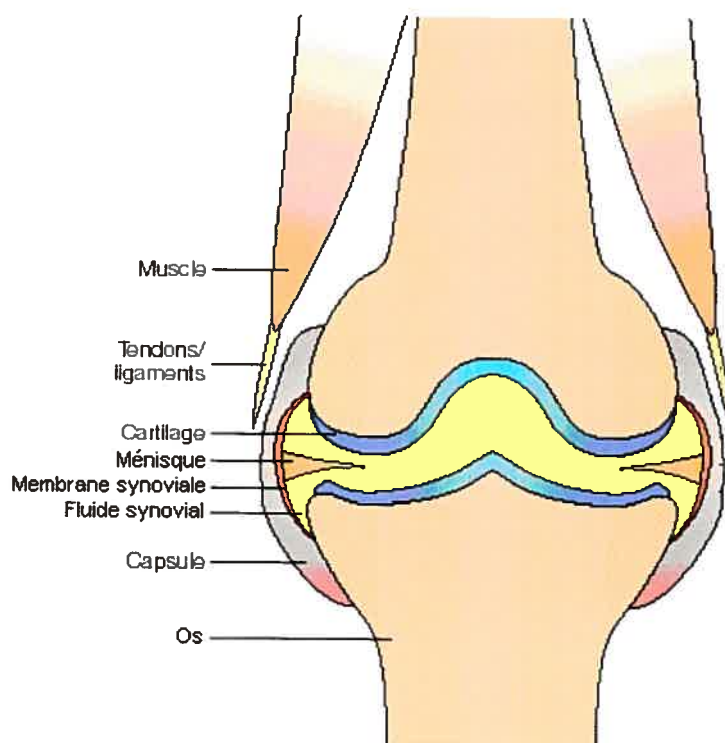
Il semble que, selon le site touché, l'OA pourrait être jusqu'à un certain point causée par des facteurs génétiques et héréditaires. En effet, il semble que chez les patients développant la maladie à un jeune âge, l'hérédité est beaucoup plus en cause qu'elle ne l'est chez les individus développant la pathologie à un âge plus avancé. L'articulation affectée témoigne aussi l'importance de l'hérédité dans l'initiation de la maladie; ainsi, il semblerait que les facteurs génétiques héréditaires soient impliqués à 50% dans l'initiation de l'OA de la hanche, alors que cette proportion se situe entre 10% et 30% pour l'OA du genou (*Demissie et al, 2002* et *Spector et al, 1996*). D'un autre côté, il semblerait, tel que vu par radiographie, que la densité osseuse plus élevée chez les patients OA que chez les sujets sains d'âge et de sexe semblable puisse être un facteur qui prédispose à développer la pathologie (*Dequeker, 1997*); par contre, une étude effectuée sur des jumeaux n'a pas réussi à démontrer une corrélation entre l'augmentation de la masse osseuse et le développement de l'OA. Cette augmentation de la densité osseuse observée par radiographie pourrait être expliquée par le fait que les ostéoblastes de l'os sous-chondral produisent plus de matrice ostéoïde mais que celle-ci est hypominéralisée (*Mansell et al., 1998*). Ainsi, la plus grande densité de collagène de type I dans la matrice pourrait apparaître comme une augmentation de la densité osseuse au niveau de la radiographie. Il est toutefois intéressant de noter que dans cette étude, une corrélation inverse est observée entre l'OA et l'ostéoporose (*Antoniades et al, 2000*). La diminution du niveau d'estradiol chez les femmes suite à la ménopause semble aussi favoriser le développement de l'OA, car une corrélation est observée entre un faible niveau d'estradiol, une faible quantité de métabolites (2-hydroxyestrone) et une plus forte prévalence de l'OA (*Sowers et al, 2006*). D'autres facteurs, tel la force musculaire, peuvent influencer le développement de l'arthrose. Chez des patients atteints d'OA du genou, il a été noté que les quadriceps

étaient plus faibles que chez les individus d'un groupe contrôle, et ce sans qu'il y ait d'atrophie musculaire (*Slemenda et al., 1997*). L'obésité représente un autre facteur pouvant favoriser l'apparition de l'OA. En effet, les individus présentant un surplus de poids développent de l'arthrose de façon précoce lorsque comparés aux individus de masse corporelle normale (*Felson et al., 1988*). L'obésité est non seulement un facteur de risque pour l'apparition de l'ostéoarthrose, mais elle favorise aussi la progression de la pathologie (*Dougados et al., 1992*). Les individus obèses atteints d'OA présentent la pathologie principalement au niveau du genou, et une perte de poids de ces individus peut prévenir l'apparition d'OA (*Felson et al., 1998*).

#### **1.4. Structure de l'articulation**

Au niveau du système musculo-squelettique, les articulations peuvent être considérées comme des organes effectuant une fonction spécifique : permettre le mouvement. Les articulations sont divisées en 3 catégories : les synarthroses, les amphiarthroses et les diarthroses. Comme elles offrent une plus grande possibilité de mouvement, les diarthroses seront décrites plus en détails dans cette section. Chaque articulation comprend plusieurs types de tissus qui sont tous essentiels au bon fonctionnement de cette structure. En fait, la structure de chaque articulation évolua de façon à devenir parfaitement conçue pour soutenir les forces mécaniques auxquelles elle fait face (*Boegard et al., 2001*). La partie externe de l'articulation comprend la capsule, qui est attachée au périoste ou au périchondrium de la diarthrose (figure 1). Reliée à la capsule, la membrane synoviale fait face à l'espace articulaire. La jonction entre la zone sous-intimale de la membrane synoviale et la capsule est indistincte. Avec les ligaments, la capsule est responsable de maintenir le contact entre les deux os de l'articulation. Dans certaines articulations, comme le genou, un ménisque est présent entre les deux surfaces cartilagineuses des articulations. Celui-ci est fait de fibrocartilage et aide à l'absorption des chocs et à la distribution des forces. Les extrémités osseuses sont recouvertes de cartilage hyalin, qui absorbe les chocs, et la cavité articulaire est remplie de fluide synovial, ce qui permet une lubrification de l'articulation, réduisant ainsi la friction. Histologiquement, les tissus de l'articulation présentent des caractéristiques importantes au niveau de leur fonction: une population

cellulaire stable, un ratio élevé de la matrice extracellulaire aux cellules et la capacité de soutenir des stress mécaniques de durée et fréquence variable. De plus, l'absence de vaisseaux sanguins au niveau du cartilage empêche la mise en place d'une réponse inflammatoire classique, impliquant vasodilatation, exudation et invasion du site inflammé par les leukocytes; en l'absence la réponse classique, le cartilage répond aux dommages avec une réaction inflammatoire qui lui est propre (Brandt *et al.*, 2003). La constitution du cartilage, de l'os, de la membrane synoviale sera discutée plus en détails dans cette section.



**Figure 1 : Structure d'une articulation.** Adapté de Wieland *et al.*, 2005.

### 1.5. Cartilage

Le cartilage joue un rôle essentiel au niveau de l'articulation, où il permet la distribution des forces et un mouvement fluide. La structure du cartilage est essentielle pour sa fonction. Le cartilage est composé de 4 couches histologiquement différentes. À la surface,

exposée au fluide synovial, se trouve la couche superficielle, qui compte la plus forte densité cellulaire du cartilage. Les chondrocytes, cellules produisant la matrice extracellulaire et étant localisées dans les lacunes de cette matrice, adoptent une forme aplatie dans cette zone. Ils sont donc dispersés parallèlement à la surface du cartilage. Au dessous de cette couche se trouve la zone transitionnelle. Les chondrocytes de cette zone sont plus sphériques et se retrouvent parfois plusieurs dans une lacune. La zone radiale, ou zone profonde, se trouve sous la zone transitionnelle. Bien que les deux soient difficiles à distinguer histologiquement, la forme ovoïde des cellules et leur alignement perpendiculaire à la surface du cartilage permettent de tracer la ligne entre ces deux couches. Finalement, la zone calcifiée se trouve au dessus de la jonction entre le cartilage et l'os sous-chondral. Les chondrocytes de cette zone se font plus rares. La jonction ostéochondrale se trouve sous le cartilage calcifiée et relie les 2 tissus l'un à l'autre. Cette jonction ostéochondrale est présente seulement dans le cartilage articulaire.

Le cartilage hyalin, ou cartilage articulaire, est majoritairement situé à la surface des articulations, dans les passages les plus larges des voies respiratoires, tel le nez et la trachée, à la jonction des côtes et du sternum et dans les plaques de croissance des os longs, où il est appelé cartilage de conjugaison. Le cartilage est toujours avasculaire et ne contient aucun nerf ni vaisseau lymphatique. L'apport nutritif des chondrocytes du cartilage articulaire se fait en partie par le fluide synovial sécrété par les fibroblastes de la membrane synoviale et par les vaisseaux sanguins présents dans l'os sous-chondral. Le périchondrium peut, de par les cellules chondrogéniques qu'il contient, initier la régénération du cartilage. Comme le cartilage articulaire est dénué de périchondrium, il ne peut pas se régénérer à la suite de dommages.

La matrice extracellulaire représente la majeure partie du cartilage adulte. Sécrétée par les chondrocytes, elle forme un réseau de fibres de collagène, de protéoglycanes, de glycoprotéines et d'autres protéines spécifiques au cartilage auxquelles l'eau s'associe. En fait, 65-70% de la masse du cartilage est composée d'eau, ce qui favorise la déformation du tissu et l'absorption de chocs. Le second élément le plus important de la composition du cartilage est le collagène de type II. Ce dernier est constitué de trois chaînes  $\alpha 1$  qui

s'associent pour former une superhélice. Initialement, le collagène type II est sécrété par les chondrocytes sous la forme de pro-collagène et est coupé par différentes enzymes extracellulaires. Une fois coupé, les trois chaînes  $\alpha$  s'associent pour former une hélice de collagène, puis ces hélices se regroupent pour former une fibrille. Ces dernières s'assemblent sous la forme d'arcs dans la matrice extracellulaire, soient perpendiculaires à la surface du cartilage dans les zones profondes et parallèles à la surface dans les zones superficielles, et distribuent ainsi les forces et la pression exercées sur le tissu. La matrice extracellulaire contient aussi d'autres types de collagènes, comme le collagène de type IX. Ce dernier est composé de trois chaînes encodées par des gènes différents. Dans la zone calcifiée du cartilage, la matrice contient principalement des cristaux d'apatite de calcium (*Revell et al., 1990*). Responsable de l'hydratation du cartilage, l'aggrécane constitue 90% des protéoglycanes présents dans le cartilage. Ce protéoglycane est composé d'une protéine centrale, à laquelle sont attachés des glycosaminoglycanes, majoritairement des molécules de chondroïtine sulfate et quelques kératanes sulfates. Quelques oligosaccharides y sont aussi liés (*Reginster et al., 1999*). Une fois excrétée, l'aggrécane forme des agrégats en se liant à l'hyaluronate par son domaine G1 situé en N-terminal. Environ 200 molécules d'aggrécane peuvent se lier à une molécule d'hyaluronate. D'autres protéoglycanes sont présents dans le cartilage, comme le biglycane, décorine, fibromoduline, anchorine, versicane, perlicane, lumicane, chondroacherine et la protéine riche en arginine qui se termine par une région riche en leucine (PRELP) (*Isenberg et al., 2004; Klippel et al., 2001*).

## 1.6. Os

Les os possèdent d'importantes fonctions physiologiques. En plus de supporter le corps et les charges qui y sont exercées, ils sont responsables de la rigidité qui permet la locomotion. Certains os, comme la cage thoracique et le crâne, sont chargés de protéger les organes internes. Les os servent de réservoir à près de 90% du calcium présent dans le corps humain et contiennent aussi du phosphate et d'autres minéraux. Trois types cellulaires se retrouvent dans l'os : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes (*Vander et al., 2001*). Les ostéoblastes sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire et sont issus des cellules mésenchymateuses. Ils répondent aux différents

facteurs endocriniens et aux stress mécaniques tout en dirigeant la minéralisation de la matrice osseuse. Issus des ostéoblastes, les ostéocytes sont emprisonnés dans la matrice minéralisée. Responsables de la résorption osseuse, les ostéoclastes sont multinucléés et d'origine hématopoïétique. Tout comme pour le cartilage, les cellules du tissu osseux sont emprisonnées dans une matrice extracellulaire. Par contre, celle-ci est minéralisée et sert de source de calcium et de phosphate pour l'ensemble de l'organisme, tout en apportant la rigidité caractéristique du squelette. Le phosphate et le calcium sont entreposés sous formes de cristaux d'hydroxyapatite  $[(Ca_5(PO_4)_3(OH)_2)]$ . La matrice osseuse est composée à 90% de collagène de type I. Les 10% restants sont composés des cristaux d'hydroxyapatite et de différentes protéines caractéristiques de l'os, comme l'ostéocalcine (OC), l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéopontine et des protéoglycanes comme la décorine et le biglycane. La structure de l'os compact comprend une multitude d'ostéons. Ceux-ci sont constitués d'un canal harvésien en leur centre et de plusieurs lamelles concentriques. Chaque ostéon est encerclé d'une couche de ciment. Les ostéocytes sont disposés de façon concentrique dans les ostéons et communiquent entre eux grâce à leurs extensions cellulaires (*Junqueira et al., 2003*). L'os trabéculaire est fait de plusieurs cavités connectées entre elles, ce qui lui donne un aspect spongieux. Il est situé à l'intérieur des épiphyses et est entouré d'os compact (*Gartner et al., 2000*).

Le remodelage osseux joue un rôle important dans l'homéostasie du tissu et les apports en minéraux et ce tout au long de la vie d'un vertébré. Ainsi, les cellules de l'os peuvent communiquer entre elles et gérer le remodelage osseux. L'ostéoclasie, soit le processus de résorption osseuse prenant place suite à l'attaque de l'os par les ostéoclastes, peut être initiée par l'hormone parathyroïdienne (PTH) et le 1,25-dihydroxycholecalciferol (forme active de la vitamine D<sub>3</sub>); de plus, le processus peut être inhibé lors de la liaison de calcitonine aux ostéoclastes (*Rang et al., 2003*). Différentes étapes sont impliquées dans l'ostéoclasie. Premièrement, les ostéoclastes activés doivent migrer vers le site de résorption. Ensuite, ils adhèrent à la surface osseuse et réarrangent leurs domaines membranaires pour générer entre autre la bordure en brosse. Dans cet espace clos créé par l'ostéoclaste, la dissolution de la matrice calcifiée prend place suite à l'acidification de l'environnement. La bordure en brosse contient une pompe à proton, qui sécrète des ions



H<sup>+</sup>, et aussi différentes enzymes pouvant dégrader la matrice, comme des métalloprotéases matricielles (MMPs) et des cathepsines. Une fois la résorption terminée, les ostéoclastes meurent par apoptose ou redeviennent quiescents (*Väänänen et al, 2000*). La communication entre les ostéoblastes et l'implication de la triade du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANK), du ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANKL) et de l'ostéoprotégérine (OPG) est essentielle à la résorption osseuse. En réponse à une stimulation par la PTH ou la vitamine D<sub>3</sub>, les ostéoblastes expriment RANKL à leur surface. Les précurseurs des ostéoclastes, quant à eux, expriment RANK. La liaison de RANKL/RANK initie la maturation des ostéoclastes et ainsi la résorption osseuse. Les ostéoblastes peuvent contrôler l'activation des ostéoclastes en produisant l'OPG, un récepteur soluble de RANKL qui compétitionne avec RANK pour son site de liaison (*Martin, 2004*, figure 2). Suite à la résorption, les ostéoblastes entreprennent la reconstruction de la matrice en déposant une nouvelle matrice qui sera ensuite minéralisée. Chez les adultes, ces deux phases s'équilibrent pour maintenir la masse osseuse totale. Par contre, l'équilibre entre la régénération et la résorption peut être altérée lors de l'ostéoporose et l'ostéopétrose. L'élément déclenchant la régénération est toujours inconnu, mais comme il est connu que l'os contient différents facteurs de croissance dans sa matrice (PDGF, FGF, TGF, IGF, BMP), il est possible que la dégradation de la matrice par les ostéoclastes libère ces derniers, ce qui initie ainsi la régénération de la matrice (*Isenberg et al., 2004; Harris et al., 2005*).

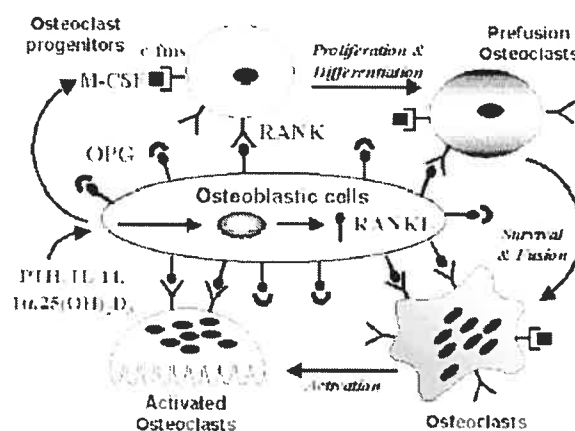
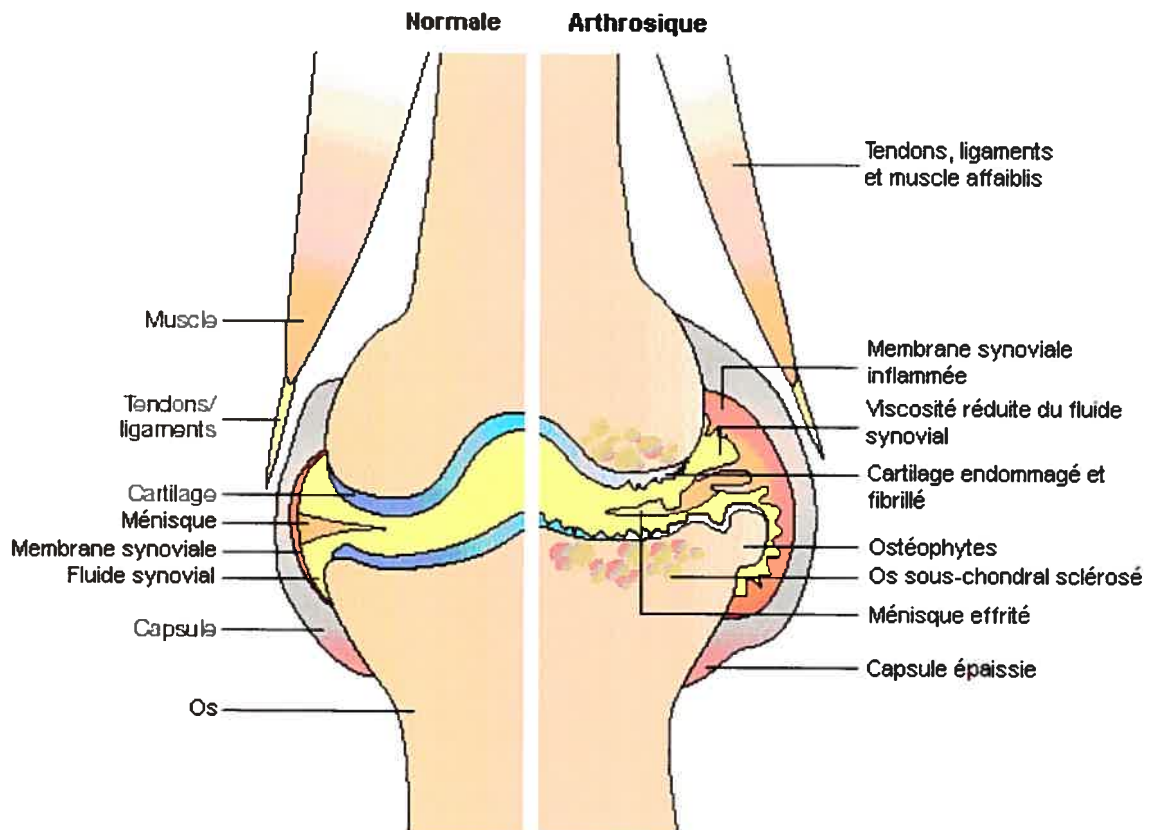


Figure 2 : Régulation de l'activité des ostéoclastes par RANK/RANKL/OPG (*Martin, 2004*)

L'os peut être généré de deux façons, soit par ossification intramembranaire ou par ossification endochondrale. Les os longs impliqués dans l'OA sont générés par ossification endochondrale. Lors de l'embryogenèse, du cartilage hyalin forme une version miniature de l'os à être généré. Un collier osseux apparaît sur la surface externe de la section centrale du modèle cartilagineux. Le cartilage situé à l'intérieur du collier osseux entame ensuite un processus de calcification impliquant l'hypertrophie et l'apoptose des chondrocytes. Commenant au centre de la diaphyse, des vaisseaux sanguins entrent dans la matrice calcifiée par une ouverture créée par des ostéoclastes. Ceci permet aux cellules ostéoprogénitrices d'accéder à la matrice calcifiée et d'y déposer des ostéoblastes, qui initient l'ossification de la matrice, ce qui génère le premier foyer d'ossification. Par la suite, un processus similaire prend place aux épiphyses de l'os pour créer les centres d'ossification secondaires. L'expansion et le remodelage des foyers d'ossification créent une cavité qui se remplit graduellement de moelle osseuse, créant l'os trabéculaire. Une partie du cartilage, celle qui est à l'extrémité des épiphyses, ne sera pas modifiée et restera en tant que cartilage hyalin à la surface de l'os. Une plaque de cartilage appelée plaque de croissance est présente entre le premier et les seconds foyers d'ossification. Celle-ci est nécessaire à la croissance longitudinale des os et disparaîtra à l'âge adulte avec l'arrêt de la croissance. La plaque de croissance contient cinq zones différentes. Dans la zone au repos, le cartilage hyalin ne présente aucune modification. La zone suivante, soit la zone proliférative, les chondrocytes s'aplatissent et forment des amas de cellules empilées parallèlement à l'axe long de l'os. Dans la zone hypertrophique, le volume des chondrocytes augmente et la matrice séparant les chondrocytes devient de plus en plus mince. Dans la zone de cartilage calcifiée, les chondrocytes se soumettent à l'apoptose et des cristaux d'hydroxyapatite se déposent dans la matrice. Finalement, dans la zone d'ossification, les structures permettant l'ossification endochondrale apparaissent : les capillaires et les ostéoblastes prennent la place des chondrocytes et créent la matrice osseuse, formant ainsi l'os trabéculaire (*Junqueira, 2003*).

### 1.7. Membrane synoviale

La membrane synoviale est composée de deux couches : l'intima et la sous-intima, qui sont juxtaposées à la capsule de l'articulation. L'intima comprend trois types de cellules : A, B et C. Les cellules A forment le tiers des cellules totales de cette couche de la membrane synoviale. Ces synoviocytes sont en fait des macrophages et expriment différents marqueurs qui les identifient et qui agissent comme récepteurs. Les synoviocytes A produisent des enzymes pouvant endommager le cartilage et des cytokines pouvant influencer l'inflammation intra-articulaire et l'activation des ostéoclastes. Parmi ces enzymes se trouvent des cathepsines, collagénases, élastases et stromélysines. Les synoviocytes de type B sont les plus répandus et sont en fait des fibroblastes. Quant aux synoviocytes de type C, ils sont des précurseurs des types A et B et forment moins de 1% du total des synoviocytes de cette couche. Il est à noter que les synoviocytes A se situent plus à la surface faisant face à l'articulation tandis que les synoviocytes B se retrouvent dans la zone basale de l'intima. La matrice de l'intima sert de support aux cellules et permet aussi de créer un obstacle qui réduit la diffusion des molécules vers le fluide synovial. La matrice de l'intima contient de la fibronectine, de la tenascine, de l'entacine, de la laminine et du collagène de type III, IV, V et VI. La couche sous-intimale est constituée de tissus conjonctif soit adipeux, fibreux ou aréolaire. Différentes cellules peuvent s'y trouver, comme des mastocytes, macrophages, fibroblastes, plasmocytes ou encore des cellules mésenchymateuses non-différenciées (*Moskowitz et al, 2001*).



**Figure 3 : Modifications de l'articulation lors de l'OA.** (Wieland et al, 2005)

### 1.8. Portrait de la pathologie

Associée avec le vieillissement, l'OA est définie comme "un groupe de maladies articulaires caractérisées par des réponses répétitives à des blessures suivies d'une régénération, réparation et dégradation des tissus de l'articulation, incluant le cartilage articulaire, l'os, la membrane synoviale et les tissus périarticulaires" (Pritzker, 1994). La caractéristique la plus importante de l'OA est la nature irréversible des dommages faits à la structure et aux tissus de l'articulation (figure 3). De plus, la pathologie se caractérise par une fibrillation et une dégradation du cartilage au niveau de l'articulation touchée. Les modifications et la dégénération engendrées par l'arthrose au niveau des articulations affectent à la fois le cartilage, l'os sous-chondral et la membrane synoviale. Par contre, les données présentes dans la littérature actuelle ne permettent pas d'identifier lequel de ces tissus est affecté le premier et génère l'arthrose. Les modifications dans chacun de ces

tissus pourraient jouer un rôle dans la pathologie. Il a été observé que le cartilage vieillissant devient jaunâtre suite à l'accumulation de lipides et des produits de glycation avancés (AGEs), comme la pentosidine (*DeGroot et al., 1999*). L'accumulation de pigment lipidique, d'AGEs et aussi d'amyloïde due au vieillissement entraîne une réduction de la synthèse de protéoglycanes et une diminution de la réplication cellulaire (*van Valburg et al., 1997*). L'âge affectant la composition du cartilage, des changements quantitatifs et qualitatifs prennent place au niveau des glycosaminoglycanes. Ceux-ci deviennent plus courts, tandis que la concentration de kératane sulfate de type 4 diminue au profit de celle de type 6 (*Klippel et al., 2001*). Bien que le cartilage âgé connaisse une dégénérescence, il a été préalablement sujet à plusieurs réparations. En présence de stimuli appropriés, les chondrocytes et ostéoblastes, emprisonnés dans leur matrice extracellulaire, peuvent se multiplier et modifier la composition de la matrice extracellulaire. Chaque cellule emprisonnée dans la matrice est responsable d'une zone qui fait de 10 à 30 fois son volume. En réponse à une blessure, le cartilage suit un chemin prédéfini. Premièrement, l'oedème s'installe dans la matrice extracellulaire et les cellules, avant de mourir, sécrètent des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire. Par conséquent, la matrice est dégradée et les produits de dégradation s'additionnent aux débris de dégradation cellulaire. Lors du processus de dégradation, il y a possibilité de renverser les changements apportés seulement si les chondrocytes adjacents à ceux qui ont subi l'apoptose ou la nécrose ont survécu. Dans un tel cas, les chondrocytes adjacents deviendront hypertrophiques et produiront un surplus de protéoglycanes qui absorberont l'excès d'eau. Toutefois, ce processus de réparation est limité. Le cartilage OA présente à la fois une capacité réduite à se réparer et une plus grande manifestation de dégradation (*Kim et al., 1991*). Les zones du cartilage soumises directement à des forces mécaniques démontrent majoritairement des changements dégénératifs, alors que les zones adjacentes qui portent moins de charges présentent une certaine régénération, qui découle de l'hypertrophie des cellules et de la plus grande production de protéoglycanes (*Gahunia et al., 1995*). La première réaction à une blessure, l'oedème, est fréquemment présente dans les articulations OA (*Boegard et al., 2001*). Comme il fut mentionné dans une section précédente, l'eau est la composante principale du cartilage et sa présence dans le cartilage est administrée par les protéoglycanes produits par les chondrocytes. L'oedème du cartilage est donc le résultat de

la dégradation des protéoglycanes de la matrice, réduisant ainsi la capacité de cette dernière à gérer son contenu d'eau. Le cartilage présentant de l'oedème voit sa matrice extracellulaire s'élargir, ce qui réduit la densité du réseau fibreux et rend le cartilage plus mou et sensible aux dommages mécaniques. Ce cartilage est plus fragile et développe facilement une fibrillation matricielle et une délamination des fragments de la matrice suite à une réponse à des forces physiques. Ces deux modifications sont considérées comme caractéristiques de l'OA (*Bartel et al., 1986*).

Dans les phases précoces de l'OA, les chondrocytes de la zone superficielle, à côté de la fibrillation, se soumettraient à l'apoptose. Ce processus serait le résultat d'un stimulus chimique et non d'une réaction à un dommage mécanique (*Blanco et al., 1998*). Toutefois, la présence de l'apoptose dans l'OA est toujours contestée. Tant et aussi longtemps que la dégradation de la matrice touche seulement les protéoglycanes, les changements subis par cette dernière sont réversibles. Dans les zones plus profondes du cartilage, les chondrocytes deviennent hypertrophiques et hyperplasiques, tout en devenant activés. Une fois activés, les chondrocytes sécrètent, en plus des protéoglycanes, différents facteurs. Les MMPs, ADAMTS-4 et ADAMTS-5, espèces d'oxygène réactives (ROS), activateurs de plasminogène et cathepsine sont tous produits en plus grande quantité par les chondrocytes activés. Malheureusement, avec la progression de l'OA, une dégradation du réseau de collagène prend place initialement dans la zone superficielle et ensuite progresse vers une dégradation périchondrale dans la zone superficielle et transitionnelle (*Hwang et al., 1992*). Généralement, dans les échantillons sains, la dégradation du collagène de type II se fait dans la zone adjacente aux chondrocytes et commence dans la couche superficielle. Ce processus de dégradation s'amplifie avec l'âge et est fortement présent chez les patients OA (*Hollander et al., 1997*). La production d'enzymes de dégradation par les chondrocytes est responsable de ces dégâts.

Dans le cartilage OA, il y a une augmentation de la production de certaines MMPs : MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-13, MMP membranaire de type 1 (MT1-MMP). L'activateur de plasminogène et la cathepsine B sont aussi augmentés (*Moskowitz et al., 2001*). Les métalloprotéinases sont importantes dans la dégradation des diverses

composantes de la matrice extracellulaire du cartilage. Cette famille de protéases contient des collagénases qui peuvent couper le collagène de type II. Ce dernier se dénature suite à la coupure et se retrouve ainsi exposé aux attaques d'autres collagénases et métalloprotéinases. Parmi les collagénases, la collagénase-3 (MMP-13) est la plus efficace pour couper le collagène de type II (*Mitchell et al., 1996*). Les collagénases 1, 2 et 3 sont sécrétées en tant que pro-enzymes. Ces dernières doivent donc être coupées avant de devenir actives. La collagénase-1 est activée par la stromélysine 1, alors que la collagénase-3 est activée par la gélatinase A et la MT1-MMP (*Knäuper et al., 1996*). D'autres enzymes, telles la MT1-MMP et la stromélysine-3, sont activées avant leur sécrétion par les chondrocytes. L'activité des enzymes pouvant couper le collagène est augmentée chez les patients OA (*Billinghurst et al., 1997*). De plus, l'expression des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMPs) est plus basse chez les patients OA que chez les individus normaux, indiquant que dans les cas d'OA, la diminution du niveau de TIMPs pourrait empêcher l'inhibition par ces dernières des MMPs (*Isenberg et al., 2004*). En tentant de s'adapter aux changements de leur environnement, les chondrocytes du cartilage articulaire touché entament une réexpression des protéines normalement produites par les chondrocytes hypertrophiques. Plusieurs cas d'OA présentent une ossification du cartilage articulaire (*Gordon et al., 1984*). Dans les cas avancés d'OA, une expression de marqueurs osseux tel l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline, le collagène type X et l'ostéopontine soutiennent la théorie selon laquelle les chondrocytes hypertrophiques OA présentent le même phénotype que les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance (*Brandt et al., 2003*).

L'os sous-chondral est aussi impliqué dans la pathologie de l'OA. L'interaction entre le cartilage et l'os sous-chondral est importante; ainsi, les modifications locales prenant place au niveau du cartilage entraînent des modifications locales au niveau de l'os sous-chondral, tel des kystes, une altération du taux de formation osseuse, bouleversements des structures trabéculaires et ostéoïdes (*Matsui et al., 2004*). Toutefois, la séquence exacte du développement de l'OA, soit les dommages initiaux prenant place au niveau de l'os ou du cartilage et affectant ensuite le tissu voisin, est toujours matière à débat. Par exemple, certains espèces animales, comme la souche Dunkin Hartley de cochon d'Inde, présentent

des changements similaires à ceux observés lors de l'OA et au cours desquels les modifications au niveau de l'os sous-chondral prennent place avant celles au niveau du cartilage (*Billingham et al., 1996*). En fait, les zones de l'articulation soumises à un plus grand stress développent un épaissement de l'os sous-chondral préalablement à la dégénération du cartilage. Malgré tout, une fois remodelée, la matrice de la plaque sous-chondrale touchée est moins hydratée et moins compacte que la matrice située plus loin de la zone de stress (*Burr et al., 1997*). Il semble que le remodelage osseux soit élevé chez les patients OA. Une augmentation locale de l'expression de la phosphatase alcaline (AP), l'enzyme responsable de la minéralisation, est visible chez au niveau de l'os sous-chondral OA, ce qui indique une augmentation de la synthèse osseuse. Également, l'augmentation du niveau de MMP indique que la résorption est aussi augmentée chez les patients OA (*Stewart et al., 1999*). À force de remodelage osseux, la plaque devient plus fragile et des microfractures peuvent apparaître. De plus, une nécrose peut être présente dans l'os trabéculaire sous la surface articulaire (*Brandt et al., 2003*).

Comme le cartilage et l'os sous-chondral sont les deux tissus impliqués dans la répartition des forces au niveau de l'articulation, des altérations faites à l'un de ces tissus créent inévitablement un impact sur l'autre. Comme il a été mentionné précédemment, les patients atteints d'ostéoporose sont rarement atteints d'OA. La densité osseuse, la résorption de l'os et l'organisation de ce dernier peuvent potentiellement affecter la dégénération du cartilage. Cet argument soutient l'idée que l'os peut affecter la dégénération du cartilage et pointe ainsi vers l'importance de son rôle lors du développement de l'OA. En fait, il a été démontré que les ostéoblastes obtenus de tissus OA peuvent influencer directement le métabolisme du cartilage (*Westacott et al., 1997*). Entre autre, les ostéoblastes et chondrocytes peuvent sécréter du TGF- $\beta$  et des BMPs, qui peuvent affecter le remodelage des matrices osseuses et cartilagineuses (*Ripamonti et al., 1997*). Au cours de l'OA, la surface osseuse peut se retrouver exposée lorsque le cartilage qui la couvre est complètement érodé. L'os de cette zone apparaît poli et sa surface devient lisse. L'os ayant ce phénotype est aussi appelé os éburné. Lorsque deux surfaces osseuses se font face suite à une dégradation du cartilage sur celles-ci, elles peuvent adapter leurs



crêtes et rainures l'une à l'autre (*Rogers et al., 1993*). Par contre, cette adaptation bouscule la structure et la répartition des charges de l'articulation affectée.

Les ostéophytes sont parfois observés chez les patients OA. On les retrouve généralement à la jonction des diarthroses et au niveau des vertèbres. Parfois, s'ils compriment un nerf par exemple, ils peuvent être à l'origine de douleur. Ils peuvent aussi, selon leur emplacement, nuire au mouvement normal de l'articulation. Jusqu'à maintenant, la faible corrélation observée entre la présence d'ostéophytes et les dommages encourus par le cartilage laissent croire qu'il y a peu ou pas d'implication des ostéophytes dans la pathologie de l'arthrose. Malgré tout, il a été noté pour des cas d'OA primaire (cas d'OA qui ne résultent pas de dommages préalablement causés par une autre pathologie, comme l'arthrite rhumatoïde) que la l'ablation chirurgicale des ostéophytes améliore la mobilité des articulations OA. Il est donc possible que les ostéophytes possèdent un rôle de stabilisateur au niveau de l'articulation OA (*van der Kraan et al., 2007*).

La membrane synoviale devient hyperplasique durant le développement de l'OA et la capsule s'épaissit. Il est aussi fréquent que la membrane synoviale s'étende jusqu'à la surface articulaire, ce qui crée un pannus (*Isenberg et al., 2004*). Une inflammation légère est notée au niveau de la membrane synoviale lors de l'OA. Suite à la dégradation du cartilage, des débris de la matrice peuvent se détacher et se retrouver dans le fluide synovial. Les cellules de la membrane synoviale peuvent phagocyter ces débris pour ensuite être activés et produire dans le fluide synovial différents médiateurs, comme les MMPs et des cytokines (*Klippel et al., 2001*). Dans le fluide synovial, on retrouve une concentration élevée de MMP-3 et de protéine inflammatoire du macrophage-1 (MIP-1), en plus de trouver le Fas ligand, qui induit l'apoptose lors de sa liaison au récepteur Fas (*Moskowitz et al., 2001*).

### **1.9. Inflammation**

Bien que moins prononcée que dans l'arthrite rhumatoïde, l'inflammation est notée chez les patients atteints d'OA. Comme mentionné précédemment, la dégradation des structures

de l'articulation génère des fragments de protéoglycanes et de collagène qui peuvent activer une réponse immunitaire et générer de l'inflammation. Lors de celle-ci, il y a recrutement de leukocytes et production de cytokines, chimiokines et autres molécules servant à favoriser une réponse inflammatoire. Parmi les différents cytokines secrétés lors de l'OA, l'interleukine-1 (IL-1) est très importante, puisqu'elle pourrait activer la production d'enzymes responsables de la destruction du cartilage (collagénase et stromélysine) (*Pelletier et al., 1995*). Le facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), bien que moins puissant que l'IL-1 dans l'initiation de l'inflammation lors de l'OA, pourrait lui aussi activer la production d'enzymes destructrices et peut aussi induire la production d'IL-1 (*Brennan et al., 1989*). Chez les patients présentant de l'OA avancée, l'augmentation de la production d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  serait telle qu'elle atteindrait des niveaux généralement observés chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (*Smith et al., 1997*). D'autres molécules pro-inflammatoires comme l'interleukine-12, l'oxyde nitrique et l'interleukine-6 seraient aussi présents chez les patients, bien que leur rôle exact dans la pathologie soit encore indéterminé (*Brandt et al., 2003*).

### 1.10. Traitement

Présentement, l'OA est incurable. Les traitements disponibles visent donc à améliorer la condition et la qualité de vie des individus aux prises avec la pathologie. Comme la douleur est un facteur important de l'OA, la majorité des traitements cherchent à diminuer voire éradiquer la douleur. Différentes options sont possibles, chacune présentant un degré d'efficacité variable selon le stade de la pathologie, la présence de phases inflammatoires et la réponse au traitement. Premièrement, il est suggéré aux patients présentant un surplus de poids de retrouver leur poids santé. Des séances de physiothérapie ou d'exercices physiques peuvent aussi aider les patients à regagner un tonus musculaire, ce qui peut atténuer la douleur tout en augmentant la mobilité (*Ge et al, 2006*). Lorsque ces mesures sont insuffisantes, trois options pharmacologiques sont offertes : les analgésiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les corticostéroïdes. Pour les douleurs légères à moyennes, l'acétaminophène est recommandé, vu son efficacité et sa sûreté (*Dougados, 2006*). Lorsque la douleur tarde à disparaître avec l'acétaminophène, il est possible de donner au patient une combinaison d'acétaminophène et d'un analgésique comme la

codéine. D'autres possibilités incluent l'administration d'un AINS ou la combinaison d'acétaminophène et d'un AINS (*Jawad, 2005*). Parmi les AINS les plus utilisés lors de l'OA, on trouve l'ibuprofène, l'acide acetylsalicylique, le nabumetone, le diclofenac, le piroxicam, et le naproxen. Malheureusement, comme les AINS affectent la synthèse des prostaglandines via l'inhibition des cyclooxygenases 1 et 2 (COX), des effets secondaires au niveau de la voie gastro-intestinale sont observés suite à l'inhibition de la COX-1 (*Brody et al, 1998*). Pour cette raison, les patients devant utiliser des AINS de façon chronique se voient prescrire des médicaments qui protègent la voie gastro-intestinale, comme l'omeprazole et le misoprostol. Toutefois, cette inhibition de la synthèse des prostaglandines est bénéfique en ce qui concerne la réduction de la douleur. Avant d'être retiré du marché, le rofécoxib montrait des résultats prometteurs chez les patients OA en inhibant seulement la COX-2, ce qui réduisait les effets secondaires affectant le système gastro-intestinal (*Garner et al., 2004*). Il est possible lors des phases inflammatoires de faire une infiltration de corticostéroïdes dans l'articulation touchée. L'effet généré est de court terme, soit d'une semaine ou deux (*Bellamy et al, 2005*). Lorsque toutes ces options ont échoué et que la condition du patient se détériore, il est possible de faire une arthroplastie et de remplacer l'articulation défaillante par une nouvelle articulation en polymère (*Dieppe et al., 2005*).

## 2. Galectines

Jusqu'à maintenant, 14 membres de la famille des galectines ont été identifiés chez les mammifères. Elles reconnaissent les groupements  $\beta$ -galactosides via leur domaine de reconnaissance des glucides (Carbohydrate Recognition Domain, ou CRD). Ce domaine conservé comprend environ 130 acides aminés. Cette famille peut être divisée en 3 groupes en fonction des structures présentes dans ces protéines. Le premier groupe, les galectines prototypiques, comprend les galectines -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 et -14. Ce groupe se caractérise par la présence d'un seul CRD. Le groupe des galectines chimériques comprend seulement galectine-3 (gal-3). La combinaison d'un domaine N-terminal riche en proline et glycine et d'un CRD. Le dernier groupe, les galectines avec séquences répétées en tandem, est formé de deux CRDs distincts mais homologues et inclus les galectines -4, -6, -8, -9 et -12 (*Hirabayashi et al, 1993*). Les galectines peuvent être extracellulaires, à la surface des

cellules, intranucléaires et cytoplasmiques. De plus, les galectines ne possèdent pas de séquence leur permettant d'être sécrétées et empruntent ainsi la voie non-classique pour quitter la cellule (*Hughes, 1999*).

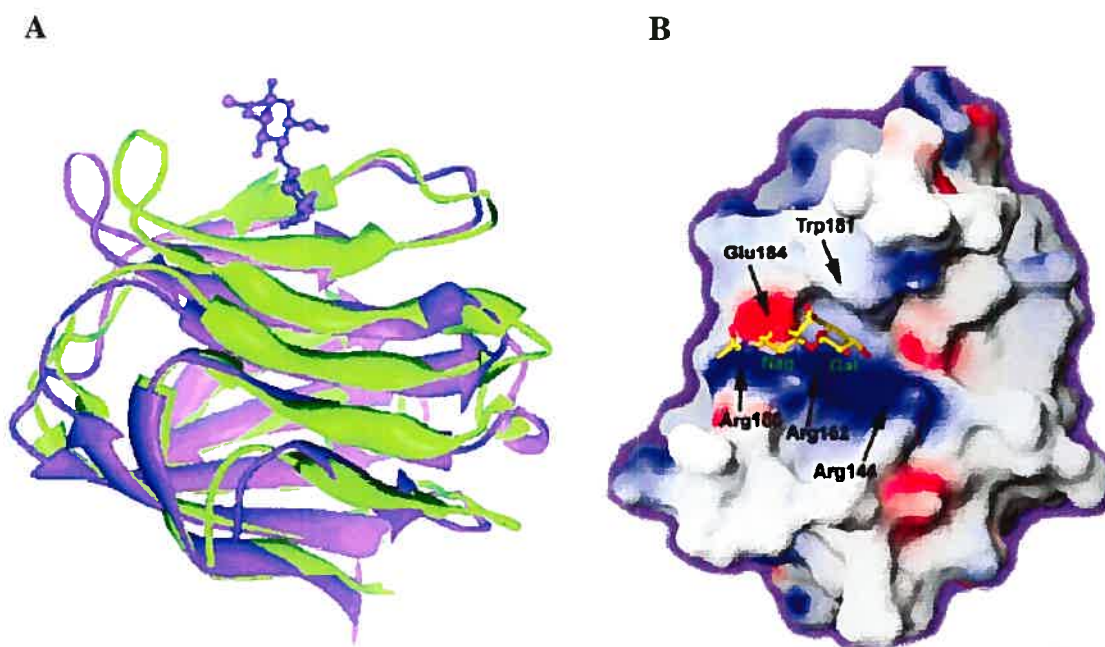
### 3. Galectine-3

#### 3.1. Distribution et structure

La gal-3 fut identifiée au début des années 1980 (*Roff et Wang, 1983*) après avoir été isolée à partir de fibroblastes murins 3T3. Ces fibroblastes produisaient une protéine pouvant se lier aux glucides contenant des groupements galactose. Cette liaison ne nécessitait pas la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . La nouvelle protéine fut initialement nommée CBP-35 (carbohydrate-binding protein 35). La gal-3 a un poids moléculaire de 30 kDa et est présente dans différents types de cellules : les fibroblastes (*Roff et Wang, 1983*), les ostéoblastes (*Aubin et al., 1996*), les chondrocytes, les ostéocytes et ostéoclastes (*Colnot et al., 1999*), les cellules thyroïdiennes transformées (*Paron et al., 2003*), les cellules tumorales mammaires (*Oshieng et al., 1999*), les cellules tumorales du colon (*Bresalier et al., 1998*) et certaines sous-populations de cellules tumorales du lobe antérieur de l'hypophyse (*Riss et al., 2003*). La gal-3 est aussi présente chez plusieurs leukocytes, tel les lymphocytes T (*Joo et al., 2001*), les macrophages (*Sato et al., 1994*), les neutrophiles (*Gil et al., 2006*). La gal-3 est probablement exprimée dans d'autres types cellulaires et des recherches plus approfondies permettront de mieux connaître la distribution de cette protéine dans les cellules.

La structure du CRD de gal-3 a été étudiée par cristallographie (figure 4). Le CRD est fait comme un sandwich avec un feuillet  $\beta$  à six brins (S1-S6) faisant face à un feuillet  $\beta$  à 5 brins (F1-F5). Le site de liaison aux sucres se trouve dans une petite pochette située sur les brins S4 à S6. La structure  $\beta$ -galactose du ligand interagit avec le site de liaison via des liaisons hydrogènes au niveau des acides aminés His<sup>158</sup>, Asn<sup>160</sup>, Arg<sup>162</sup> et Asn<sup>174</sup> situés sur les feuillets S4 et S5. Une autre liaison hydrogène est formée entre le ligand et le CRD au niveau de Glu-184. La structure  $\beta$ -galactose crée aussi une liaison Van der Waals avec Trp<sup>181</sup> (*Seetharaman et al., 1998*). Les résidus Trp<sup>181</sup> et Glu<sup>184</sup> sont situés sur la boucle 177-184 entre les feuillets S5 et S6b. Cette boucle contient aussi le motif NWGR, dont le rôle

sera approfondi dans une section suivante. En absence de ligand, la pochette se referme partiellement lorsque les boucles S4-S5 et S5-S6a se déplacent vers le centre. Cette position restreint l'accès à la pochette et par le fait même au site de liaison. Il est possible qu'un tel mécanisme soit utilisé pour éviter d'exposer inutilement le site de liaison en absence de ligand, cachant ainsi le segment NWGR et limitant les interactions de ce dernier (*Umemoto et al., 2003*). Il est à noter que gal-3 se lie préférentiellement aux disaccharides, comme le lactose et la N-acetyllactosamine (*Dumic et al., 2006*).



**Figure 4 : Structure de gal-3 et du CRD.** A) Structure de gal-3 en absence (vert) et en présence (violet) d'un ligand. L'extrémité N-terminale se trouve au bas du diagramme. Il est à noter que les résidus 163-169 se trouvent à gauche du ligand dans la partie supérieure du diagramme, alors que les résidus 175-184 se retrouvent à droite. B) Potentiel électrostatique du domaine CRD de gal-3. Les zones rouges sont chargées négativement alors que les zones bleues sont positives. Le ligand N-acetyllactosamine est représenté en jaune. (*Umemoto et al., 2003*)

La gal-3 a une structure unique parmi les galectines. La chaîne d'acides aminés de gal-3 forme 2 domaines distincts, soit un domaine N-terminal atypique et un domaine CRD à l'extrémité C-terminale. Le domaine N-terminal contient une séquence consensus constituée de répétitions des acides aminés Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly-X-X-X. Cette

séquence rend la région N-terminale riche en proline et en glycine (*Agrwal et al., 1993*). De plus, le domaine N-terminal possède une homologie de 25% avec la séquence de l'hélice  $\alpha$ -1 du collagène type II bovin; par conséquent, le domaine N-terminal est aussi appelé « collagen-like » (*Raz et al., 1989*). Une coopérativité du domaine N-terminal avec le CRD a été observée lors d'essais de liaison avec de la laminine immobilisée. Cette coopérativité n'était pas observée si le domaine N-terminal de la gal-3 avait été préalablement coupé à l'aide de collagénase bactérienne (*Massa et al., 1993*). D'autres enzymes peuvent couper le domaine N-terminal de la gal-3; entre autre, certaines métalloprotéinases matricielles telles que MMP-2 et MMP-9, peuvent initier une protéolyse de ce domaine (*Ochieng et al., 1998*). La collagénase-3 coupe aussi gal-3 au même site que MMP-2 et MMP-9 (*Guévremont et al., 2004*). Les 12 premiers acides aminés du domaine N-terminal, qui ne comprennent pas de séquence consensus, jouent un rôle important dans la fonction de la gal-3. La délétion de cette séquence de 11 acides aminés en N-terminal réduirait aussi la capacité de gal-3 à se dimériser (*Gong et al., 1999*).

### 3.2. Galectine-3 intracellulaire

La gal-3 intracellulaire se situe au niveau du noyau et du cytoplasme. Comme la gal-3 ne possède pas de séquence de localisation nucléaire ni de séquence de localisation extracellulaire, la façon dont elle se déplace d'un compartiment à l'autre de la cellule n'a pas été élucidée. La phosphorylation de Ser<sup>6</sup> est importante pour l'export de la gal-3 du noyau vers le cytoplasme (*Tsay et al., 1999*). Différentes voies semblent être disponible pour la translocation de gal-3 vers le noyau. Initialement, les dix derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale furent identifiés comme responsable de l'importation de la galectine-3 vers le noyau (*Davidson et al., 2000*). Une voie passive impliquerait une diffusion du cytoplasme vers le noyau et une voie comprendrait un transport actif nécessitant l'extrémité N-terminale ou encore une liaison de la gal-3 avec le complexe importine- $\alpha/\beta$  (*Nakahara et al., 2006*). Une séquence d'export nucléaire (NES) capable de se lier à l'exportine CRM1 a été identifiée chez la gal-3 (*Li et al., 2006*). Les mécanismes entourant le transport de la gal-3 du cytoplasme au noyau et vice versa demeurent toujours incertains.

L'expression de la gal-3 par différents types de cellules tumorales corrèle avec le potentiel néoplasique de ces cellules dans plusieurs types de cancer, comme les cancers du colon et de la thyroïde (*Xu et al., 1995; Schoeppner et al., 1995*). De plus, l'expression de la gal-3 correspond avec le potentiel métastatique de certaines cellules tumorales (*Raz et al., 1990*). Le motif NWGR présent au niveau du CRD présente une homologie de séquence avec le domaine BH1 de la famille des molécules anti-apoptotiques Bcl-2. Cette séquence NWGR est responsable de l'activité anti-apoptotique générée par les protéines de cette famille. La transfection de lignées cellulaires tumorales n'exprimant pas la gal-3 a démontré que la gal-3 préviendrait l'apoptose de ces cellules et que le motif NWGR serait responsable de cette activité (*Akahani et al., 1997*). Comme la gal-3 peut s'associer avec Bcl-2 via son domaine C-terminal (*Yang et al., 1996*), il serait possible qu'elle fasse partie d'un complexe comprenant Bcl-2 qui prévient l'apoptose. L'effet anti-apoptotique de gal-3 pourrait être expliqué par sa capacité à se localiser au niveau de la mitochondrie et de d'empêcher la perte du potentiel membranaire et le relargage du cytochrome c suite à un stimulus pro-apoptotique. Pour ce faire, la gal-3 a besoin d'interagir avec la synexin, qui semble jouer un rôle essentiel dans la localisation de gal-3 du cytoplasme à la mitochondrie lors de stimuli apoptotiques (*Yu et al., 2002*). La présence de la gal-3 au niveau de la mitochondrie est donc importante pour contrer l'apoptose, mais sa phosphorylation l'est tout autant.

En effet, il a été démontré que la Ser<sup>6</sup> de gal-3 peut être phosphorylée par les caseines kinases I et II (*Huflejt et al., 1993*). La Ser<sup>12</sup> serait aussi phosphorylée par les mêmes kinases, quoique la Ser<sup>6</sup> semble être le site majeur de phosphorylation. En l'absence des 12 premiers acides aminés de la séquence N-terminale, la gal-3 n'est pas sécrétée par la cellule. De plus, l'absence de cette séquence restreint la présence intracellulaire de la gal-3 au cytoplasme et on observe une absence de gal-3 au niveau de la membrane plasmique et du noyau. Ces mécanismes ne dépendent toutefois pas de la phosphorylation de la Ser<sup>6</sup> par la caseine kinase I.

La phosphorylation de la Ser<sup>6</sup> est un facteur important pour le rôle anti-apoptotique de gal-3. Lorsque la Ser<sup>6</sup> n'est pas phosphorylée, la gal-3 ne protège plus les cellules de

l'apoptose suite à une perte d'attachement à la matrice extracellulaire. De plus, une mutation de la sérine pour une alanine (S6A) soustrait à la gal-3 son pouvoir anti-apoptotique. Il a donc été suggéré que la gal-3, dans un mécanisme dépendant de la phosphorylation de la Ser<sup>6</sup>, augmente l'expression de la cycline D1 suite à une perte d'attachement, tout comme l'expression des inhibiteurs de CDK p21<sup>WAF1/CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> et diminue l'expression de la cycline A, pour ainsi initier l'arrêt en G1 suite à un stimulus apoptotique (*Yoshii et al., 2002*). La phosphorylation en Ser<sup>6</sup> altère la liaison de gal-3 et de ses ligands; en effet, la liaison de gal-3 avec ses glycoconjugués spécifiques est réduite lorsque la Ser<sup>6</sup> est phosphorylée et la déphosphorylation de cette dernière rétablit le niveau normal de liaison (*Mazurek et al., 2000*). Par conséquent, l'état, phosphorylé ou non, de la gal-3 est déterminant pour son action biologique. Dans les cellules tumorales mammaires exprimant la gal-3, on observe un réarrangement de l'expression des isoformes de Ras. Chez les cellules n'exprimant pas la gal-3, l'isoforme N-Ras est majoritaire alors que les cellules tumorales exprimant la gal-3 détiennent un plus haut niveau de l'isoforme K-Ras. Cette différence dans l'expression des isoformes de Ras influence aussi l'activation des effecteurs en aval dans la cascade de signalisation cellulaire. Ainsi, les cellules tumorales exprimant gal-3 avaient un niveau de phospho-ERK plus élevé et un niveau de phospho-Akt et Ral-GTP plus bas que les cellules n'exprimant pas gal-3. L'activité anti-apoptotique de gal-3 dans ces cellules implique donc la cascade K-Ras/MEK (*Shalom-Feuerstein et al., 2005*). Des cotransfections faites chez des cellules humaines embryonnaires rénales ont confirmé que gal-3 interagit préférentiellement avec l'isoforme K-Ras, tout en favorisant l'augmentation du ratio Ras-GTP/Ras-GDP suite à une stimulation par EGF. Ainsi, la gal-3 augmente l'activation de K-Ras, qui ensuite active PI3K et Raf-1 tout en réduisant l'activation de ERK par K-Ras (*Elad-Sfadia et al., 2004*). Il est donc certain que gal-3 se lie à K-Ras et influence la signalisation engendrée par ce dernier, ce qui pourrait expliquer la résistance des cellules tumorales à l'apoptose.

D'autres expériences effectuées sur différentes souches de cellules tumorales indiquent que lors de l'induction de l'apoptose par UV via p53, qui réduit l'expression de gal-3 au niveau de la transcription. Pour que cet événement prenne place, p53 doit être activé par HIPK2, qui effectue une phosphorylation de p53 à la Ser<sup>46</sup>. Cette répression de gal-3 est nécessaire



à l'apoptose initiée par p53. Ces résultats suggèrent que gal-3 pourrait agir de façon similaire aux membres de la famille de Bcl-2 et serait réprimé lors d'événements apoptotiques déclenchés par p53 (*Cecchinelli et al., 2006*). Les capacités anti-apoptotiques de gal-3 peuvent être observées dans différents types de cellules. Par exemple, les patients souffrant d'arthrite idiopathique juvénile, une maladie semblable à l'arthrite rhumatoïde où l'inflammation endommage peu à peu le cartilage, présentent une expression élevée de gal-3 dans les cellules fibroblastiques de la membrane synoviale et les cellules inflammatoires mononucléaires isolées du fluide synovial (*Harjacek et al., 2001*).

La gal-3 joue un rôle important dans le développement osseux. Il a été démontré qu'il y a une forte expression de la gal-3 au niveau du squelette embryonnaire murin (*Fowles et al., 1995*). La protéine est aussi exprimée au niveau des ostéoblastes, notamment dans les cellules obtenues à partir de crânes de fœtus de rats (*Aubin et al., 1996*). Il a aussi été démontré que l'expression de la gal-3 est augmentée *in vitro* chez les chondrocytes hypertrophiques (*Nurminskaya et al., 1996*). L'étendue de l'expression de la gal-3 dans la plaque de croissance des souris foetales et néonates démontre que les chondrocytes des zones prolifératives et hypertrophiques expriment la protéine, mais que cette expression est réduite vers la fin de la zone hypertrophique, près de la zone de calcification. Les ostéoblastes et ostéocytes expriment aussi la gal-3 (*Colnot et al., 1999*). La gal-3 dirigerait la survie des chondrocytes hypertrophiques lors de l'ossification endochondrale. En effet, la grande quantité de lacunes vides près de la jonction chondrovasculaire des souris gal-3 KO laisse présumer qu'il y a un fort renouvellement des chondrocytes à ce niveau. De plus, les cellules vasculaires n'envahissent pas aussi rapidement les lacunes que chez les animaux sauvages, ce qui implique qu'il y a un manque de synchronisation entre l'apoptose des chondrocytes et l'invasion vasculaire. Malgré tout, l'expression des différents marqueurs de l'os et du cartilage varie peu. Seule l'expression de Ihh se retrouvait légèrement augmentée dans la plaque de croissance des souris gal-3 KO (*Colnot et al., 2001*). En tenant compte de tous ces résultats, il est probable que la gal-3 soit impliquée dans le développement osseux en étant exprimée par les chondrocytes lors de la prolifération de ces derniers, à partir du niveau de la zone proliférative de la plaque de croissance. Les chondrocytes continuent le processus d'ossification et vers la fin de la zone

hypertrophique, l'expression de la gal-3 est réduite. Les chondrocytes hypertrophiques sont donc sujets à l'apoptose et l'ossification prend place. Dans un tel processus, le rôle anti-apoptotique de la gal-3 semble plausible.

D'autres rôles de la gal-3 intracellulaire ont été étudiés, cette fois au niveau nucléaire. La gal-3 semble être impliquée dans l'épissage des pré-ARNm et se lie de façon lectine-indépendante à la matrice nucléaire (*Dagher et al., 1995; Wang et al., 1995*). Pour participer à l'épissage des ARNm, la gal-3 doit se lier à son partenaire, Gemin4. La gal-3 est impliquée dans la cascade de signalisation de Wnt. Il est connu que la gal-3 se lie à la  $\beta$ -caténine (*Shimura et al., 2004*). En plus, la gal-3 se lie via son extrémité C-terminale à l'axine, le partenaire de la  $\beta$ -caténine dans la cascade Wnt. La gal-3 est phosphorylée par glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , une enzyme pouvant phosphoryler  $\beta$ -caténine et l'identifier pour l'ubiquitination et la dégradation (*Shimura et al., 2005*). Récemment, il a été découvert que la gal-3 est exprimée dans le tissu adipeux humain, plus particulièrement dans les préadipocytes. De plus, la gal-3, en se liant à des résidus glucidiques, peut augmenter la synthèse d'ADN et initier la prolifération des préadipocytes (*Kiwaki et al., 2007*). En ayant un tel rôle chez les adipocytes, il est possible que la gal-3 soit impliquée dans différentes pathologies impliquant ces cellules, dont l'obésité.

Ligand	Function associated with galactin-3 binding
Laminin	Modulates cell ECM adhesion
Collagen IV	Modulates cell ECM adhesion
Fibronectin/vitronectin	Modulates cell ECM adhesion
Heparin	Maintains terminal differentiation of epithelial cells
Elastin	Promotes adhesion of cells to elastin
Mac-2BP (ga-99)	Promotes cell-cell and cell-ECM adhesion
Cutlinin	Adhesion and endocytosis
MP20 lens protein	Cell-ECM adhesion
Colon cancer mucins	Cell-cell and cell-ECM adhesion
Carcino-embryonic antigen (CEA)	Cell-cell and cell-ECM adhesion
Advanced glycosylation end products (AGE)	Mediates endocytosis of AGE
$\alpha 5 \beta 1$ Integrins	Modulates cell ECM adhesion
$\alpha M \beta 1$ (CD11b/18, Mac-1 antigen) (human macrophages)	Modulates cell ECM adhesion
CD44a/CD44b (human neutrophils)	Induces migration, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidase and adhesion of cells to ECM
CD38 (Jurkat cells)	Induces uptake of extracellular C <sub>3</sub> and modulates cell-ECM adhesion
CD44/CD38 (T lymphocytes)	Inhibits apoptosis and modulates cell-ECM adhesion
FcgRII (human eosinophilic leukemia cells)	Downregulates of IL-5 gene expression
NCA-100 (human neutrophils)	Induces an oxidative burst in neutrophils
Neural cell adhesion molecules (NCAM), MAG, L1	Modulates cell-ECM adhesion
IgE (rat basophilic leukemia cells)	Triggers degranulation and serotonin release
Lamp-1, Lamp-2 (tumor cells)	Modulates cell-cell, cell-ECM adhesion
Lipopolysaccharides (LPS) (bacteria)	Adhesion of pathogen organisms to host ECM and cells

**Table 1 : Ligands de la gal-3 (Ochieng et al., 2004)**

### 3.3. Gal-3 extracellulaire

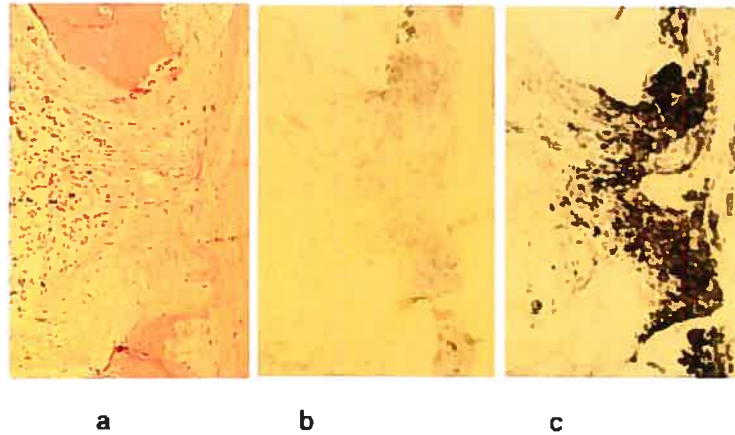
Le rôle de la gal-3 extracellulaire diffère grandement du rôle intracellulaire. Toutefois, le mécanisme dirigeant l'export extracellulaire de la gal-3 demeure encore incertain. Récemment, il a été suggéré que la gal-3 cytoplasmique s'accumule au niveau de la membrane plasmique pour ensuite être excrétée par ectocytose (Mehui et al., 2007). Ce phénomène implique la formation d'une vésicule à la surface de la membrane et l'émission de celle-ci à partir de la membrane plasmique. L'ectocytose a été préalablement identifiée chez les fibroblastes, neutrophiles et chondrocytes (Lee et al, 1993; Stein & Luzio, 1991; Hale & Wuthier, 1987). Comme les chondrocytes, les fibroblastes et les macrophages sont tous impliqués dans la pathologie de l'arthrose, il est possible que la gal-3 soit relarguée dans le fluide synovial lors de l'OA.

La gal-3 extracellulaire a été démontrée comme étant pro-apoptotique pour différents types de cellules. Entre autre, la liaison de la gal-3 avec CD7 et C29 à la surface des

lymphocytes T induit l'apoptose de ces derniers (*Fukumori et al., 2003*). La gal-3 peut aussi être appelée à favoriser l'inflammation. Par exemple, la stimulation de neutrophiles avec de la gal-3 recombinante augmente la phagocytose, la dégranulation et l'expression de CD66b de ces derniers tout en augmentant l'apoptose (*Fernández et al., 2005*). Chez les monocytes humains, la liaison de la gal-3 extracellulaire agit en synergie avec les lipopolysaccharides pour initier la sécrétion d'IL-1 (*Jeng et al., 1994*). De plus, de petites doses de la gal-3 peuvent activer la production de superoxydes par les monocytes (*Liu et al., 1995*). Il est connu que la gal-3 est un ligand des IgE. Lorsque la gal-3 se lie aux IgE chez des cellules basophiles leucémiques de rat, le réseautage de ces récepteurs initie la dégradation et la sécrétion de sérotonine tout en activant une cytotoxicité pouvant nuire aux parasites intracellulaires (*Zuberi et al., 1994*). La gal-3 contient deux sites de liaison pour les lipopolysaccharides (LPS) bactériens : un se trouve à l'extrémité N-terminale et l'autre se trouve dans le CRD (*Mey et al., 1996*). Parmi les autres récepteurs de surface pouvant se lier à la gal-3 se trouve l'intégrine  $\alpha 1 \beta 1$ ; par conséquent, il serait possible que la gal-3 soit impliquée dans l'adhésion cellule-cellule ou matrice-cellule (*Ochieng et al., 1998*). Toutefois, il semble que ces interactions nécessitent une multimérisation de la gal-3. Via son domaine N-terminal, la gal-3 peut s'oligomériser à la surface des neutrophiles. Une oligomérisation est aussi observée lorsque la gal-3 dirige l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (*Nieminen et al., 2007*). La même étude démontrait aussi la formation de lattices par la gal-3 à la surface des cellules épithéliales. Comme la galectine-9 peut retenir les récepteurs de glucose à la surface des cellules et ainsi agir sur le métabolisme du glucose (*Ohtsubo et al., 2005*), il serait possible que la gal-3 agisse de façon similaire et empêche l'internalisation de certains de ses ligands.

Il a été démontré dans différents types cellulaires que la gal-3 peut se lier aux produits de glycation avancés (AGEs) (*Vlassara et al., 1995*). Ainsi, la gal-3 fut nommée AGE-R3 initialement dans ces cellules. Les AGEs peuvent s'accumuler dans la matrice osseuse et modifier le développement et la prolifération des ostéoblastes (*McCarthy et al., 2001*). Comme la gal-3 est exprimée chez les ostéoblastes et qu'elle se lie au AGEs, il serait possible qu'elle puisse jouer un rôle dans cette modification du phénotype ostéoblastique par les AGEs. Il a été préalablement démontré que le cartilage OA exprime la gal-3 à un

niveau de 2 à 3 fois plus élevé que le cartilage normal. Dans les chondrocytes OA, la gal-3 se retrouvait au niveau du cytoplasme et de la membrane cytoplasmique. Au niveau de la membrane plasmique, une corrélation entre la présence d'intégrine- $\beta$ 1 et de la gal-3 était observée. Ainsi, la gal-3 pourrait interagir avec l'intégrine- $\beta$ 1, modifier l'adhésion des chondrocytes et ainsi jouer un rôle dans la pathophysiologie de l'OA (*Guévremont et al., 2004*). Comme mentionné précédemment, la gal-3 serait sécrétée par différentes cellules qui sont impliquées dans l'OA, tel les chondrocytes et les neutrophiles. De plus, les macrophages peuvent sécréter environ 30% de leur gal-3 intracellulaire lorsqu'ils sont activés (*Sato et al. 1994*). Les niveaux de gal-3 dans le fluide synovial des patients OA est légèrement plus élevé que chez les sujets normaux et il a été démontré que la gal-3 est abondamment exprimée par la membrane synoviale au niveau du pannus chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde et d'OA, où une dégradation de l'os et du cartilage était également observée (*Ohshima et al., 2003*, figure 5). Par conséquent, un rôle similaire pourrait être joué par la gal-3 lors de l'OA. Il est aussi possible que la gal-3 soit impliquée dans l'angiogénèse. Un modèle *in vitro* a démontré que l'absence de la gal-3 à la surface des cellules empêche la formation de tubes capillaires (*Nangia-Makker et al., 2000*). La gal-3 a été localisée dans les calvéoles et au niveau du radeau lipidique des membranes plasmiques (*Furtak et al., 2001*) et semble jouer un rôle dans l'internalisation de certains récepteurs et molécules (*Zhu et al., 2001*). Tout comme au niveau intracellulaire, la gal-3 extracellulaire prend part dans une panoplie de processus différents. Sa grande variété de ligands, tant intracellulaires que extracellulaire, y est probablement pour beaucoup.



**Figure 5 : Présence de gal-3 lors de l'arthrite rhumatoïde (RA)** La gal-3 fut détectée par immunohistochimie dans des échantillons RA et était localisée dans des zones de dégradation. **a)** Coloration hématoxyline-éosine. **b)** Contrôle négatif, IgG1. **c)** Anticorps monoclonal anti-gal-3. (*Ohshima et al., 2003*)

### 3.4. Régulation et expression de gal-3

La gal-3 fut initialement identifiée comme la protéine marqueur de macrophage 2 (mac-2). Le gène de la gal-3, LGALS3 (lectin, galactoside binding, soluble 3) comprend 17 kb et se trouve chez l'humain au niveau du chromosome 14 (*Raimond et al., 1997*). Le gène comprend 6 exons et 5 introns et la protéine générée par ce gène est de 30 kDa. La traduction de la gal-3 débute dans l'exon 2 (*Kadrofske et al., 1998*). Lorsque le promoteur de LGALS3 a été séquencé, différents sites pouvant se lier à certains facteurs impliqués dans la transcription chez les ostéoblastes ont été découverts. Ceux-ci incluent Runx-2, Ets-1, C/EBP $\beta$  et ostérix. L'expression de Runx-2, aussi appelé Cbfa1, a été préalablement étudiée et est limitée aux ostéoblastes, aux chondrocytes de la plaque de croissance et aux cellules des glandes mammaires et du nucleus pulposus. Au niveau du cartilage de la plaque de croissance et des ostéoblastes, il a été démontré que l'expression de LGALS3 est contrôlée par Runx-2 (*Stock et al., 2003*). L'expression de Runx-2 par les ostéoblastes est augmentée suite à l'augmentation des forces de traction exercées sur le tissu osseux (*Ziros et al., 2002*). De plus, il a été démontré que l'expression de Runx-2 est augmentée chez les chondrocytes humains OA (*Wang et al., 2004*). Comme les chondrocytes OA semblent présenter un phénotype semblable aux chondrocytes de la plaque de croissance, il serait possible que l'expression plus élevée de la gal-3 chez les chondrocytes OA (*Guévremont et al., 2004*) soit le résultat de l'augmentation de l'expression de Runx-2 chez les

chondrocytes OA. Des études *in vivo* avec un modèle murin ont indiqué que Runx-2 contribuait à la destruction du cartilage et à la formation d'ostéophytes et augmentait aussi l'expression de collagène type X chez les chondrocytes hypertrophiques (*Kamekura et al., 2006*). La modification de l'expression de Runx-2 et par conséquent celle de la gal-3 semble jouer un rôle important dans l'OA.

## **HYPOTHÈSES**

Suite à la détection de gal-3 dans le fluide synovial de patients RA et OA par Ohshima (*Ohshima et al., 2003*), nous avons voulu vérifier l'impact que pouvait avoir la gal-3 sur les chondrocytes et les ostéoblastes. Ainsi, nous avons généré une gal-3 recombinante et avons stimulé *in vitro* des chondrocytes et des ostéoblastes humains avec cette dernière. Nous avons aussi étudié l'effet *in vivo* de la gal-3 dans un modèle murin suite à une injection intra-articulaire de cette dernière. Par la suite, nous avons vérifié si une stimulation avec la gal-3 affectait l'expression de différents enzymes de dégradation produites par les chondrocytes ou encore de marqueurs ostéoblastiques.



## **MÉTHODOLOGIE**

### **Liste des produits**

Sucrose (Fisher, Nepean, ON)  
NaHPO<sub>4</sub> (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
KCl (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
Tris pH 8,0 (Sigma, St Louis, MO)  
Tris (Invitrogen, Burlington, ON)  
EDTA (Sigma, St Louis, MO)  
Triton x-100 (Sigma, St Louis, MO)  
HCl 37% (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
NaOH (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
NaCl (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
Isopropanol 99% (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
Tablette d'inhibiteurs de protéases Complete sans EDTA (Roche, Indianapolis, IN)  
1,4-dithiothreitol (DTT) (Roche, Indianapolis, IN)  
Imidazole (Invitrogen, Burlington, ON)  
 $\alpha$ -lactose (Sigma, St Louis, MO)  
Vecteur pTcrHis (Invitrogen, Burlington, ON)  
Bactéries DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Burlington, ON)  
Base milieu LB (Invitrogen, Burlington, ON)  
Agar LB (Sigma, St Louis, MO)  
Ampicilline (Invitrogen, Burlington, ON)  
Ensemble de purification Gfx PCR (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)  
BamHI (Invitrogen, Burlington, ON)  
EcoRI (Invitrogen, Burlington, ON)  
Agarose (Gibco BRL, Grand Island, NY)  
RNase A (Qiagen, Mississauga, ON)  
Ensemble maxi-prep (Qiagen, Mississauga, ON)  
IPTG (Invitrogen, Burlington, ON)  
Lactose-agarose (Sigma, St Louis, MO)

Résine Probond (Invitrogen, Burlington, ON)  
Acrylamide (Invitrogen, Burlington, ON)  
*Bis*[sulfosuccinimidyl] suberate (BS<sup>3</sup>) (Sigma, St Louis, MO)  
Enzyme EK Max (Invitrogen, Burlington, ON)  
Résine EK Away (Invitrogen, Burlington, ON)  
Solution acide bicinchoninic (Sigma, St Louis, MO)  
Solution sulphate de cuivre (II) (Sigma, St Louis, MO)  
Silver Stain plus (BioRad, Mississauga, ON)  
Trizol (Invitrogen, Burlington, ON)  
Chloroforme (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
Isopropanol (Laboratoires MAT, Beauport, QC)  
Éthanol 95% (Les Alcools de Commerce, Brampton, ON)  
Eau stérile (Abbott Laboratories, Saint-Laurent, QC)  
Ensemble de détection Ribogreen (Invitrogen, Burlington, ON)  
pd(N)6 3 mM (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)  
MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen, Burlington, ON)  
dNTP 10mM (Invitrogen, Burlington, ON)  
RNase OUT (Invitrogen, Burlington, ON)  
M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON)  
Taq DNA polymerase (Invitrogen, Burlington, ON)  
Platinum SYBR Green qPCR supermix-UDG (Invitrogen, Burlington, ON)  
Lipopolisaccharide (LPS) (Sigma, St Louis, MO)

### **Tampons**

PBS: NaCl 140 mM  
NaHPO<sub>4</sub> 5,4 mM  
KCl 2,6 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM

Tampon STET : Sucrose 8%  
Tris 50mM pH8  
EDTA 50mM  
Triton X-100 0,5%

Tampon d'équilibration : 200 ml tampon A  
NaCl 150 mM

Tampon A : Tris 20mM  
EDTA 5mM  
Ajuster le pH à 7,5

Tampon B : DTT 1mM  
10 tablettes d'inhibiteurs de protéase (Complete)  
500 mL de tampon A

Tampon C : DTT 1mM  
100 mM de tampon d'équilibration

Tampon D : PBS

Tampon E : Lactose 150 mM  
25 ml PBS

Tampon PBS pH8 : 250 mL PBS  
Ajuster le pH à 8 avec NaOH 0,5 N

Tampon imidazole 20mM : Imidazole 20mM  
50 ml PBS  
Ajuster le pH à 8 avec HCl

Tampon imidazole 250 mM : Imidazole 250 mM

50 ml PBS

Ajuster le pH à 8 avec HCl

TE : Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Ajuster le pH à 7,5

Tampon PCR 10X : Tris base 100 mM

KCl 500 mM

Stériliser, puis aliquoter.

Tampon Laemmli 6X : Tris HCl pH 6,8 360 mM

Glycerol 57,6 %

SDS 400 mM

Bleu bromophénol 0,012 %

B-mercaptoéthanol 30%

### Amorces

Gène amplifié	Amorce	bp
RANKL	S : CACTATTAATGCCACCGAC AS : GGGTATGAGAACTTGGGATT	260
OPG	S : GTCTGAAACATAGGAGCTG AS : GTTTACTTTGGTGCCAGG	347
Gal-3 (expression)	S : TAGTTAGAATTCATGGCAGACAATTTTCGCTCCA AS : GCAGGGAATTCAGATTATACATGGTATATGAAGC	750
CRD Gal-3 (expression)	S : TAGTTAGGATCCGGCGCCCCTGCTGGGCCACTGATT AS : GCAGGGAATTCAGATTATACATGGTATATGAAGC	432

\* Toutes les amorces proviennent d'Invitrogen (Carlsbad, CA)

### **Clonage du domaine CRD de gal-3**

Le domaine CRD fut amplifié à partir du vecteur pTcrHisA contenant un insert gal-3. L'ADN obtenu migra sur un gel 1,2% agarose à 100V pendant 1 heure. Les bandes à 432 paires de base furent coupées et leur ADN extrait avec un ensemble d'extraction Gfx selon le protocole du fabricant. L'ADN du CRD et le vecteur pTcrHisA furent digérés avec BamHI et EcoRI selon le protocole du fabricant. Les digestions furent purifiées par Gfx et 1 µl des échantillons fut repris dans 19 µl d'eau avant d'être migrés sur un gel d'agarose 1,2% à 100V pendant 1h. Le CRD digéré fut ensuite inséré dans le vecteur selon le protocole du fabricant selon un ratio CRD/vecteur de 2,5 :1. Un volume de 5 µl de la ligation CRD ou du vecteur vide fut ajouté à 50 µl de bactéries DH5α. Les tubes furent incubés sur glace 30 mins, puis ils furent immergés à 42°C pendant 30s pour générer un choc thermique. Les tubes furent mis sur glace avant de d'y ajouter 250 µl de LB. Ils furent incubés 1h à 37°C avec agitation. Des géloses LB/Ampi avec 70 µl des ligations furentensemencées. Les colonies CRD et vecteur vide furent repiquées et incubées en LB avec 100 µg/ml d'ampicilline avec agitation à 37°C pendant la nuit. L'ADN bactérien des culots fut extrait selon le protocole de mini-rapide, notre protocole maison de mini-prep. 1,5 ml de culture bactérienne fut centrifugé à 10 000 rpm pendant 3 min et le surnageant fut enlevé. Le culot fut resuspendu dans 100 µl de tampon STET. La solution fut vortexée pendant 30s, puis chauffée à 100°C pendant 1 min, avant d'être centrifugée à 10 000 rpm pendant 15 min. Le surnageant fut transféré dans un tube propre et 120 µl d'isopropanol et 7 µl de NaCl 5M y furent ajoutés. Les échantillons furent mis -80°C pendant 10 mins avant d'être centrifugés à 10 000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les culots CRD furent récupérés dans 20 µl d'eau et ceux du vecteur vide dans 15 µl d'eau. 2 µl de RNase A (2 mg/mL) furent ajoutés et la solution fut incubée à 37°C pendant 15 min. L'ADN fut conservé à -20°C jusqu'à utilisation. L'ADN du CRD et du vecteur vide furent digérés avec BamHI et EcoRI selon le protocole du fabricant. Les échantillons migrèrent sur gel d'agarose 1,2% à 100V pendant 1h30. Le clone 9 fut repiqué en LB et incubé à 37°C pendant 8h. Un volume de 300 µl du clone 9 fut ajouté dans 150 ml de LB avec 100 µg/ml d'ampicilline et incubé avec agitation à 37°C pendant la nuit. Une maxi-prep fut faite selon le protocole du fabricant et l'ADN fut dosé. L'ADN CRD fut digéré avec EcoRI et BamHI puis

l'échantillon fut migré sur gel d'agarose 1,2% à 100 V pendant 1h. L'ADN CRD fut séquencé.

### **Purification de gal-3 et CRD sur colonne lactose-agarose**

Un aliquot de bactéries exprimant la gal-3 ou CRD fut mis dans 250 mL de milieu LB avec 100 µg/ml d'ampicilline et fut incubé toute la nuit avec agitation à 37°C. Au matin, 50 ml de la culture furent répartis dans chacun des deux flacons erlenmeyer stériles contenant 950 ml de milieu LB avec 100 µg/ml d'ampicilline. La DO fut lue à chaque heure à 600nm jusqu'à ce qu'elle atteigne 0,6. Lorsque la DO fut à 0,6, l'IPTG fut ajouté pour obtenir une concentration de 1mM et la culture fut incubée pendant 6 heures. La culture bactérienne fut ensuite centrifugée à 4000 rpm pendant 30 minutes puis le milieu fut décanté. Les culots furent repris dans un total de 60 ml de tampon B froid et la solution fut séparée dans deux tubes. Ces derniers furent congelés dans un bain d'isopropanol et de glace carbonique avant d'être transférés dans un congélateur à -80°C. Au moment voulu, les tubes furent décongelés au bain-marie à 37°C en prenant soin à ce que les tubes restent froids. La solution fut soniquée pendant deux cycles à 12W et un cycle à 27W. La solution fut vortexée 1 minute entre chaque cycle. Les tubes furent recongelés dans un bain d'isopropanol et de glace carbonique. Les étapes de décongélation, sonication et congélation furent faites une autre fois. Les étapes de décongélation et sonication furent refaites une fois de plus avant d'ajouter 3,5g de NaCl à la solution. Les tubes furent vortexés 2x2 minutes. Ensuite, 340 ml de tampon B furent ajoutés pour générer un total de 400 ml de solution avec une concentration finale de NaCl de 150 mM. La solution fut répartie dans des tubes à centrifugation et centrifugée 30 minutes à 15 000 rpm. Le surnageant fut récupéré et un échantillon fut pris avant de passer la solution sur une colonne de lactose-agarose préalablement équilibrée en tampon d'équilibration. Toutes les étapes suivantes furent faites à 4°C. La colonne fut rincée avec 100 ml de tampon C et un échantillon de l'éluat fut pris. La colonne fut rincée avec 100 ml de PBS et un échantillon de l'éluat fut pris. La galectine-3 fut éluée avec le tampon E et un échantillon de l'éluat fut pris. Des colonnes distinctes doivent être utilisées pour la purification de gal-3 et du CRD, puisque la gal-3 n'est pas complètement éluée après cette étape et pourrait ainsi contaminer le CRD. 62,5 µl de NaOH 0,5N furent ajoutés à l'éluat pour produire un pH d'environ 8.

La résine Probond fut activée selon le protocole du fabricant puis l'équilibrée en PBS pH 8. La colonne fut remplie avec la solution de gal-3 ou de CRD éluée et fut mise sous agitation pendant 2 heures pour que la protéine se lie à la résine. La solution fut éluée et un échantillon fut pris. 50 ml de PBS pH8 froid furent utilisés pour rincer la colonne et un échantillon de l'éluat fut pris. La colonne fut rincée avec le tampon 20mM imidazole et un échantillon de l'éluat fut pris. La protéine fut éluée avec le tampon imidazole 250mM et un échantillon de l'éluat fut pris. L'éluat fut transféré dans un boudin à dialyse avec micropores et dialysa en PBS à 4°C pendant 3 jours. Le PBS de la dialyse fut changé à tous les jours. La solution fut transférée dans un tube et congelée à -80°C. Après au moins 24h à -80°C, l'échantillon fut lyophilisé et le culot repris dans le volume approprié d'eau distillée. Les protéines furent dosées selon la méthode BCA. L'échantillon fut filtré, aliquoté en 100 µl et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

### **SDS-PAGE**

Un gel SDS-PAGE 12% acrylamide fut préparé pour les échantillons gal-3 et 15% acrylamide fut préparé pour les échantillons CRD, avec un gel de concentration de 4%. Du tampon Laemmli fut ajouté aux échantillons jusqu'à une concentration finale de 1X et 20µl des échantillons fut ajouté par puit. Les échantillons furent migrés pendant environ 1h30 à 100V. Le gel fut coloré au nitrate d'argent selon le protocole du fabricant.

### **Pontage covalent de gal-3 et CRD**

Le BS<sup>3</sup>, un agent de pontage, fut utilisé en DMEM sans sérum à une concentration de 60 mM. La gal-3 ou le CRD furent ajoutés à une concentration de 5 µg/ml en DMEM dans sérum, en présence et absence de BS<sup>3</sup>. La réaction fut incubée à 37°C pendant 2 heures. Les échantillons migrèrent sur un gel d'acrylamide de 4-12% et les résultats de ce pontage furent observés suite à une coloration au nitrate d'argent.

### **Digestion de la séquence His du CRD**

150 µg de CRD furent digérés avec EKMax selon le protocole du fabricant. L'enzyme de digestion fut isolée de la solution de CRD en passant la solution sur une résine EK-Away selon le protocole du fabricant. Le résultat de la digestion fut observé par un gel SDS-

PAGE 4-15% acrylamide coloré au nitrate d'argent des échantillons intacts, coupés et post-purification. La solution de CRD digérée (dCRD) fut mise à -80°C.

### **Dosage protéines par BCA**

Dans une plaque 96 puits, une courbe standard fut faite en ajoutant 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 µl de BSA à une concentration de 1 µg/ml. Le premier puit servit de blanc et ne contenait donc pas de BSA. 20 µl de SDS 0,5% furent ajoutés par puit, puis chaque puit fut complété avec de l'eau pour obtenir un volume total de 60 µl. 20 µl de chacun des échantillons solubilisés en SDS 0,5% furent ajoutés en duplicata avant d'ajouter 40 µl d'eau par puit. 10 ml de BCA furent mélangés avec 200 µl de sulfate de cuivre (II). 240 µl de cette solution furent ajoutés aux puits contenant les standards et les échantillons. La réaction fut développée pendant 10 minutes et avant de lire la DO à 550 nm.

### **Extraction d'ARN avec Trizol**

Pour chaque ml de Trizol utilisé pour reprendre les cellules, 200 µl de chloroforme furent ajoutés à l'échantillon. Les tubes furent agités vigoureusement pendant 15s puis incubés de 2 à 3 min à température pièce. Les tubes furent secoués à nouveau et centrifugés pendant 15 min à 12 000 rpm à 4°C. La phase aqueuse (supérieure) fut récupérée et transférée dans un tube propre. 500 µl d'isopropanol furent ajoutés par tube pour 1 ml de Trizol. Les tubes furent agités doucement par inversion et incubés 10 min à température pièce ou toute la nuit à -20°C. Les tubes furent centrifugés à 12 000 rpm pendant 15 min à 4°C. L'isopropanol fut retiré et le culot fut lavé en éthanol 95%. L'éthanol fut retiré et le culot fut séché. L'ARN fut repris dans 15 à 20 µl d'eau stérile. L'ARN fut dosé par fluorimétrie.

### **Dosage d'ARN par fluorimétrie**

Une courbe standard fut préparée en diluant 10 µl du standard ribosomique à 200 µg/ml dans 500 µl de TE. Six dilutions sérielles de cette solution furent faites en combinant 250 µl de la solution précédemment mentionnée à 250 µl de TE. Le TE seul fut utilisé comme blanc. Des dilutions 1/100 et 1/200 en TE des échantillons à tester furent préparées. 50 µl des différents standards et des deux dilutions des échantillons à doser furent ajoutés dans une plaque 96 puits. Le réactif fut préparé en ajoutant du Ribogreen au volume de TE



nécessaire à un ratio de 1 :200. 50 µl de réactif fut ajouté aux puits à doser et la fluorescence fut lue à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm, une longueur d'onde d'émission de 530 nm et un « cutoff » de 495 nm.

### **Digestion à la DNaseI**

Pour chaque µg de RNA à traiter, les réactifs suivants furent ajoutés: 1 µl de tampon réaction DNaseI 10X, 1 µl DNaseI 1U/ µl. Le volume fut complété jusqu'à 10 µl avec de l'eau stérile. Pour une quantité plus grande d'ARN, les volumes furent augmentés proportionnellement. Les échantillons furent incubés à température pièce pendant 15 min avant d'inactiver la DNaseI en ajoutant 1 µl d'EDTA 25mM par réaction. Les réactions furent ensuite chauffées à 65°C pendant 10 min puis congelées ou mises sur glace.

### **RT**

La réaction suivante fut préparée: 1 µg d'ARN traité à la DNaseI  
 pd(n)<sub>6</sub> 2,5 µM  
 MgCl<sub>2</sub> 5 mM  
 Tampon PCR 1X  
 Mélange dNTP 4 mM  
 RNaseOUT 80 U  
 M-MLV reverse transcriptase 400 U  
 Volume total : 40 µl

Un cycle de 45 min fut fait à 42°C suivi d'un cycle de 5 min à 99°C. Les tubes furent mis sur glace une fois terminé ou conservés à 4°C.

### **PCR quantitatif**

Une dilution ¼ de la RT fut faite en eau. Comme 1 µg d'ARN avait été utilisé pour la RT, on estime que la concentration de cDNA est de 6,25 ng/ µl.

La réaction suivante fut préparée: 10 µl de la RT diluée  
 Amorce sens 2 mM  
 Amorce anti-sens 2 mM  
 Eau 8%  
 Supremix Invitrogen 1X  
 Volume total : 25 µl

Le volume de RT nécessaire varie en fonction de la quantité de cDNA nécessaire. Pour la 18S, 5 ng de cDNA furent utilisés. Toutes les autres amorces furent utilisées à 25 ng, sauf RANKL qui fut utilisée à 50 ng. Lorsque le volume de la RT diluée utilisée était plus petit que 10 µl, il fut complété jusqu'à 10 µl avec une solution de MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM. Si la quantité de RT diluée nécessaire était plus grande que 10 µl, les volumes des réactifs furent augmentés en respectant les ratios.

Le programme suivant fut utilisé : un cycle de 2 min à 50°C, un cycle de 15 min à 95°C, et 40 cycles de 15 s à 95°C, 30 s à 60°C, 30 s à 72°C et 15 s à 77°C. La lecture se fait à 77°C.

### **PCR semi-quantitatif**

La réaction suivante fut préparée:

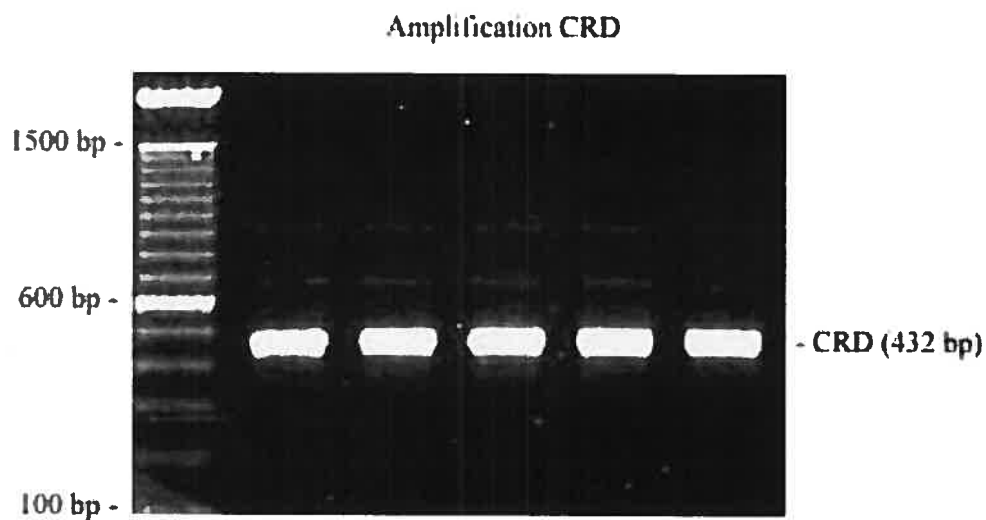
- RT 125 ng
- MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM
- Tampon PCR 1X
- Eau 78%
- Taq polymérase 2,5 U
- Amorce sens 0,25 mM
- Amorce anti-sens 0,25 mM

Un cycle d'une minute fut fait à 94°C et de 40 cycles de 1 min à 94°C suivi de 1,5 min à 60°C. Les échantillons furent mis à 4°C.

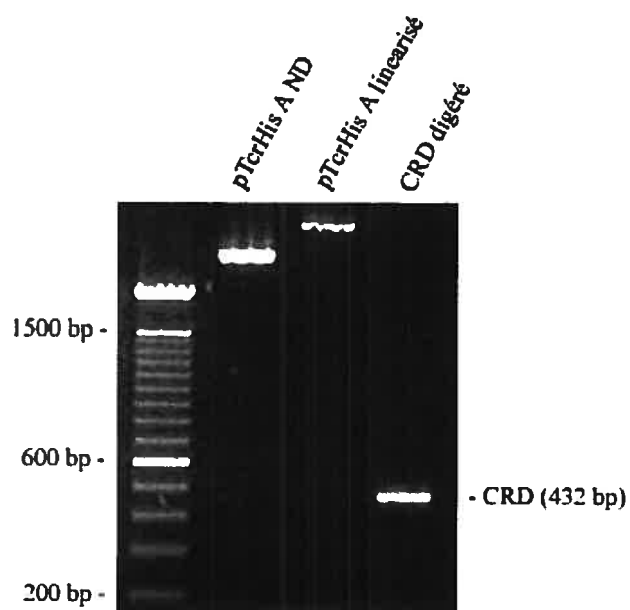
### **Stimulation des ostéoblastes**

Les cellules furentensemencées à haute densité dans une plaque et furent incubées de 1 à 2 jours en DMEM 10% FBS avec pénicilline et streptomycine, jusqu'à ce qu'elles soient confluentes. Elles furent ensuite sevrées en DMEM 0,5% FBS avec pénicilline et streptomycine, pendant 24 heures. Elles furent ensuite stimulées en absence ou présence de vitD<sub>3</sub> (concentration finale 50nM) avec les réactifs suivants: CRD ou dCRD (concentration finale de 1 µg/ml ou 5 µg/ml), LPS (concentration finale de 1 µg/ml ou 5 µg/ml) et gal-3 commerciale (10 µg/ml). Les milieux furent récupérés après 24 heures d'incubation et les cellules furent reprises avec du SDS 0,5%.

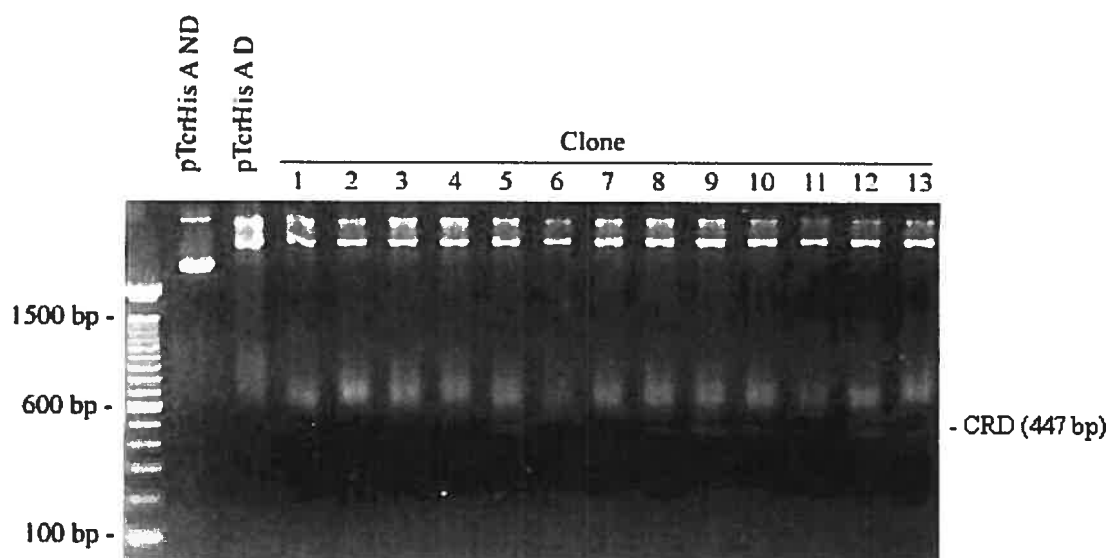
## RÉSULTATS



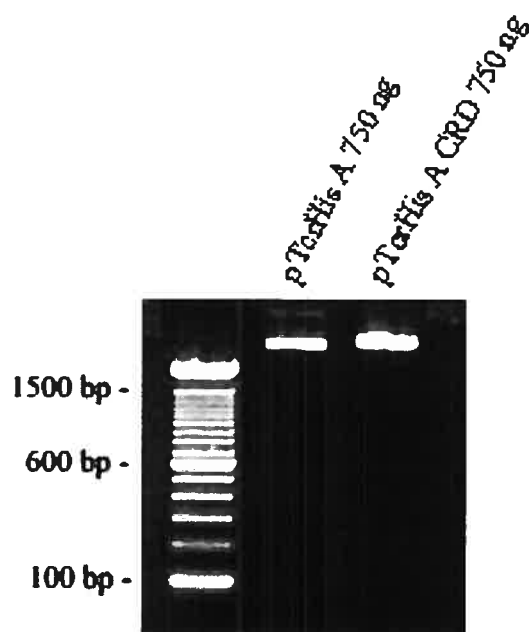
**Figure 6 : Amplification de la séquence nucléotidique du CRD à partir du vecteur pTcrHisA gal-3. Le volume de la réaction PCR étant de 100  $\mu$ l, il fut chargé dans cinq puits à raison de 20  $\mu$ l par puit.**



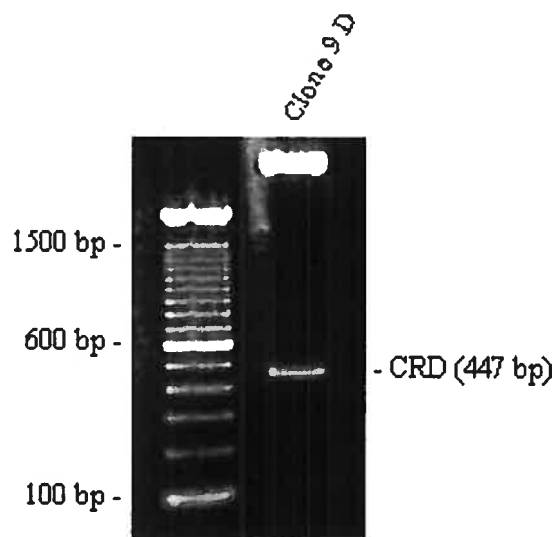
**Figure 7 : Digestion du vecteur pTcrHis A et du CRD avec BamH1 et EcoR1. ND: non-digéré.**



**Figure 8 : Dépistage des clones exprimant pTcrHis A CRD.** La digestion fut faite avec BamH1 et EcoR1. ND: non-digéré, D: digéré.



**Figure 9 : Comparaison des concentrations d'ADN.**

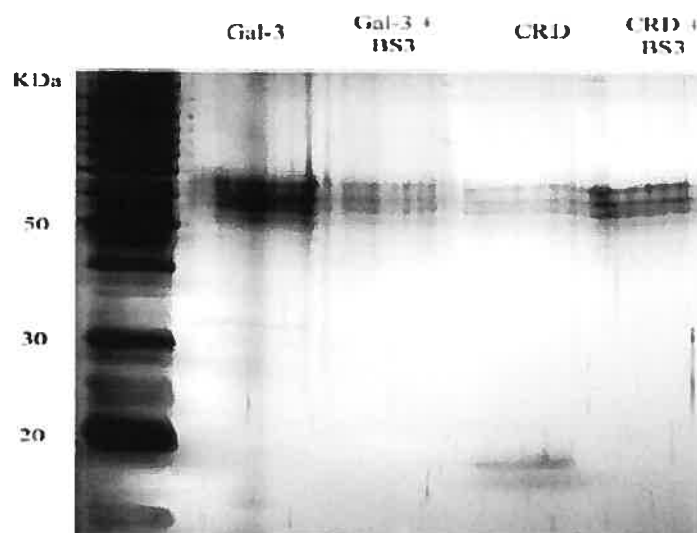


**Figure 10 : Digestion de l'ADN du clone 9.** La digestion fut faite avec BamH1 et EcoR1. D: digéré.

### Clonage de la séquence CRD

À partir d'un stock d'ADN du vecteur pTcrHis A contenant un insert de la séquence nucléotidique permettant l'expression de gal-3, nous avons amplifié la séquence CRD et généré, comme prévu, un fragment de 432 paires de base (figure 6). L'amorce a généré un seul fragment, indiquant sa spécificité pour l'amplification de CRD. Le fragment CRD et le vecteur pTcrHis A furent digérés avec BamH1 et EcoR1 (figure 7), une ligation fut faite pour insérer le fragment dans le vecteur. Ce fragment fut ensuite inséré dans le vecteur pTcrHis A, qui fut cloné dans des bactéries DH5 $\alpha$ . Le fragment de CRD inséré dans le vecteur pTcrHis A contient une quinzaine de paires de base de plus que le fragment initial, soit 447 paires de base, dû à son insertion dans le vecteur qui contient deux sites de digestion par EcoR1 en amont et en aval du site d'insertion de CRD. Dans la figure 8, une faible bande est visible à 447 paires de base chez les clones 5, 8, 9, 10 et 12. Toutefois, comme le bleu de bromophénol était à concentration élevée dans les échantillons ayant migré et que ce dernier migre à la même vitesse qu'un fragment d'ADN d'environ 300 paires de bases, les fragments de CRD apparaissent de plus faible intensité. De plus, la qualité de la photo imprimée a grandement diminué suite à sa numérisation, réduisant encore l'intensité de ces fragments. Le clone 9, qui présentait une plus forte intensité sur la

photographie, fut sélectionné pour faire une maxi-prep. Lorsque son ADN fut purifiée, elle fut dosée par spectrométrie. Cette concentration, soit 50 µg/ml, était très basse. Ainsi, pour vérifier cette donnée, un total de 750 ng de vecteur pTcrHis A et de 750 ng de l'ADN du clone 9 furent migrés. L'intensité des bandes fut observée pour évaluer la validité du dosage fait par spectrométrie (figure 9). La bande du clone 9 était légèrement plus intense que la bande du vecteur. Ainsi, le dosage réel de l'ADN du clone 9 est possiblement un peu plus élevé que la concentration déterminée par spectrométrie. Comme la bande du CRD était apparue très faiblement lors du dépistage des clones positifs, une digestion de l'ADN du clone 9 permit de confirmer l'expression de CRD par ce clone (figure 10). Pour s'assurer de la conservation de la séquence de CRD dans ce clone, la séquence de CRD fut séquencée avec l'aide des amorces préalablement utilisées pour l'amplification. Lorsque la séquence obtenue fut soumise à un BLAST, le gène de gal-3 fut identifié avec une homologie de 99%.



**Figure 11 : Essais de pontage avec BS<sup>3</sup> de galectine-3 et CRD. Effectué par Maxime Dussault-Laurendeau.**

### Pontage covalent de gal-3 et du CRD

Comme les ostéoblastes traités avec le CRD répondaient de façon identique à ceux traités avec la gal-3 quant à l'expression de l'ostéocalcine, nous avons voulu confirmer que notre CRD ne formait pas de dimères. La dimérisation joue un rôle important dans les fonctions extracellulaires de gal-3. Cette dimérisation prend place au niveau du domaine N-terminal : par conséquent, le CRD ne devrait théoriquement pas former de dimères. Dans l'échantillon ne contenant pas de Bis[sulfosuccinimidyl] suberate ( $BS^3$ ), 2 bandes sont observées : la première, plus intense, est située à 60 kDa et l'autre, beaucoup moins intense, se trouve à 32 kDa (figure 11). En présence de  $BS^3$ , la totalité de la galectine-3 est présente à 60 kDa. Quant au CRD, il présente aussi 2 bandes en absence de  $BS^3$  : une à 17 kDa et l'autre à 60 kDa. Toutefois, en présence de  $BS^3$ , le CRD forme une seule bande à 60 kDa.

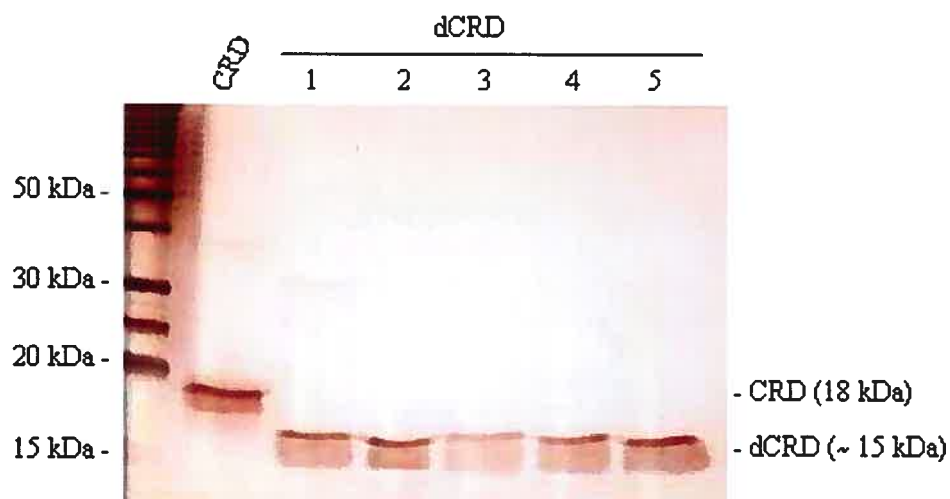
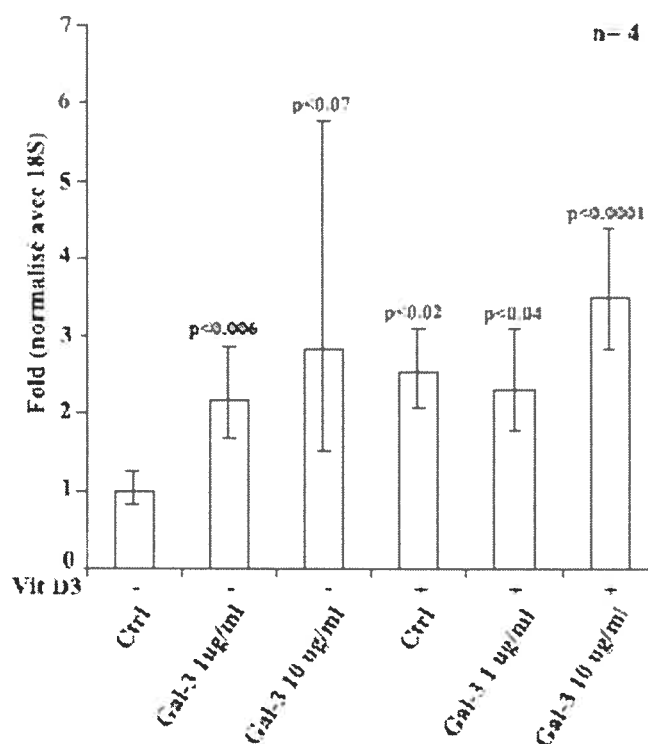


Figure 12 : Digestion de CRD avec EK-Max.

### Digestion de CRD avec EKMax

Suite à la confirmation de la multimérisation du CRD, nous avons voulu vérifier l'importance du fragment His-Tag présent sur le CRD recombinant. Le vecteur pTcrHis A contient, en amont du site de clonage, une séquence codant pour six acides aminés d'histidine. Cette séquence est présente pour faciliter la purification de peptides recombinant. Toutefois, il serait possible que cette séquence soit aussi responsable de la multimérisation du CRD que nous avons observé. Nous avons donc utilisé l'enzyme EKMax pour couper ce fragment présent sur notre CRD. Comme le volume de CRD à digérer était assez grand, le volume total de CRD fut séparé en 5 pour permettre l'utilisation de tubes eppendorf 1,5 ml, tel que recommandé dans le protocole. La digestion avec EKMax a permis de couper efficacement le fragment His-Tag et le peptide Xpress<sup>TM</sup> y étant attaché, réduisant ainsi de 3 kDa le poids de la CRD (figure 12).

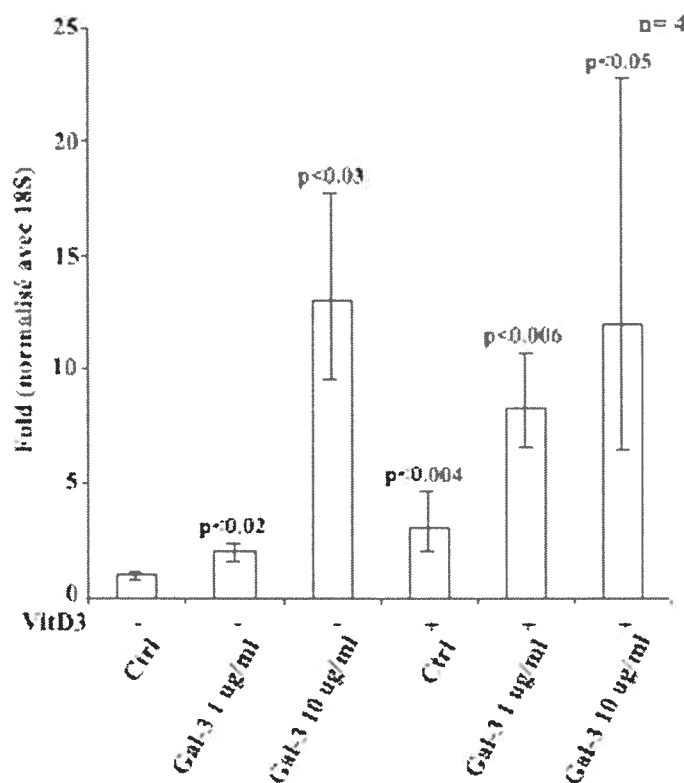


**Figure 13: Expression d'ostéoprotégérine par des ostéoblastes traités avec gal-3.** p vs (Ctrl – VitD3) pour les échantillons non-stimulés avec la VitD3 et pour le Ctrl + VitD3, et p vs (Ctrl + VitD3) pour les échantillons stimulés avec la VitD3.



### Expression de l'OPG par les ostéoblastes stimulés avec gal-3

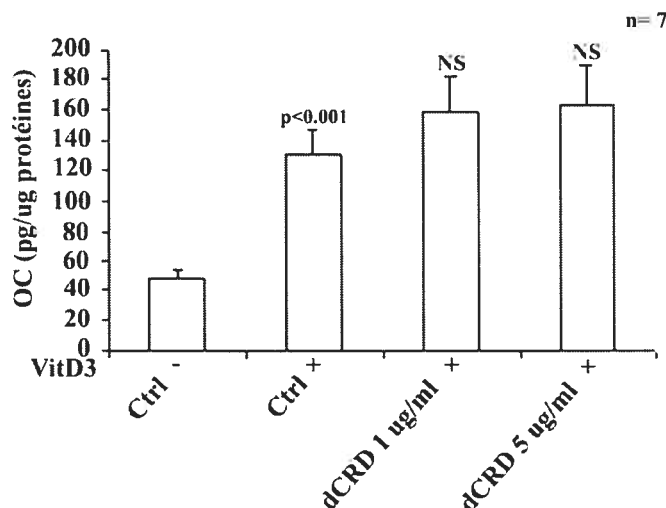
L'OPG étant un facteur important dans l'inhibition de la résorption osseuse, nous avons voulu observer si une stimulation des ostéoblastes OA avec la gal-3 affectait l'expression de ce gène. L'expression d'OPG par les échantillons fut calculée par rapport à l'expression d'OPG par le contrôle sans vitD<sub>3</sub>. En l'absence de vitD<sub>3</sub>, les échantillons traités avec gal-3 augmentent leur production d'OPG de façon dose-dépendante jusqu'à atteindre une expression trois fois plus élevée que le contrôle (figure 13). En présence de vitD<sub>3</sub>, les échantillons expriment plus d'OPG. Le contrôle avec vitD<sub>3</sub> exprime 2,5 fois plus d'OPG que son homologue sans vitD<sub>3</sub>. La plus faible concentration (1 µg/ml) de gal-3 n'apporta pas de changement à l'expression d'OPG en présence de vitD<sub>3</sub> lorsque comparé avec le contrôle. Par contre, la gal-3 présente à une concentration de 10 µg/ml montre une légère augmentation (1,4 fois) lorsque comparée au contrôle avec vitD<sub>3</sub>.



**Figure 14:** Expression de RANKL par des ostéoblastes traités avec gal-3. p vs (Ctrl – VitD3) pour les échantillons non-stimulés avec la VitD3 et pour le Ctrl + VitD3, et p vs (Ctrl + VitD3) pour les échantillons stimulés avec la VitD3.

### **Expression de RANKL par les ostéoblastes traités avec gal-3**

Tout comme OPG, RANKL joue un rôle important dans la résorption osseuse. Nous avons donc voulu déterminer si une stimulation des ostéoblastes OA avec la gal-3 générerait un effet sur l'expression de ce gène. L'expression de RANKL par les échantillons fut calculée par rapport à l'expression de RANKL par le contrôle sans vitD<sub>3</sub>. En présence et absence de vitD<sub>3</sub>, l'expression de l'ARN messager de RANKL augmente de façon dose-dépendante (figure 14). Une dose de gal-3 de 1 µg/ml augmente l'expression de RANKL de 2 fois alors que la dose de 10 µg/ml l'augmente de 13 fois en absence de vitD<sub>3</sub>. Le contrôle avec vitD<sub>3</sub> exprime trois fois plus de RANKL que le contrôle sans vitD<sub>3</sub>. L'augmentation de l'expression de RANKL suite à une stimulation par gal-3 est plus marquée en présence de vitD<sub>3</sub>. Ainsi, la dose de 1 µg/ml de gal-3 présente une expression 8 fois plus élevée que le contrôle sans vitD<sub>3</sub> et 4 fois plus élevée que la stimulation idoine en absence de vitD<sub>3</sub>. La différence entre les niveaux d'expression de la faible et de la haute dose de gal-3 utilisées est moins marquée en présence de vitamine D<sub>3</sub>. Une stimulation avec 10 µg/ml de gal-3 en présence de vitD<sub>3</sub> augmente l'expression de gal-3 12 fois comparé au contrôle dans vitD<sub>3</sub>. Les niveaux d'expression de RANKL suite à une stimulation à une concentration de 10 µg/ml est pratiquement la même en présence et en absence de vitD<sub>3</sub>. Toutefois, il est bon de noter que les variations au niveau de l'expression de RANKL étaient notables entre les différents cas traités avec 10 µg/ml de gal-3.

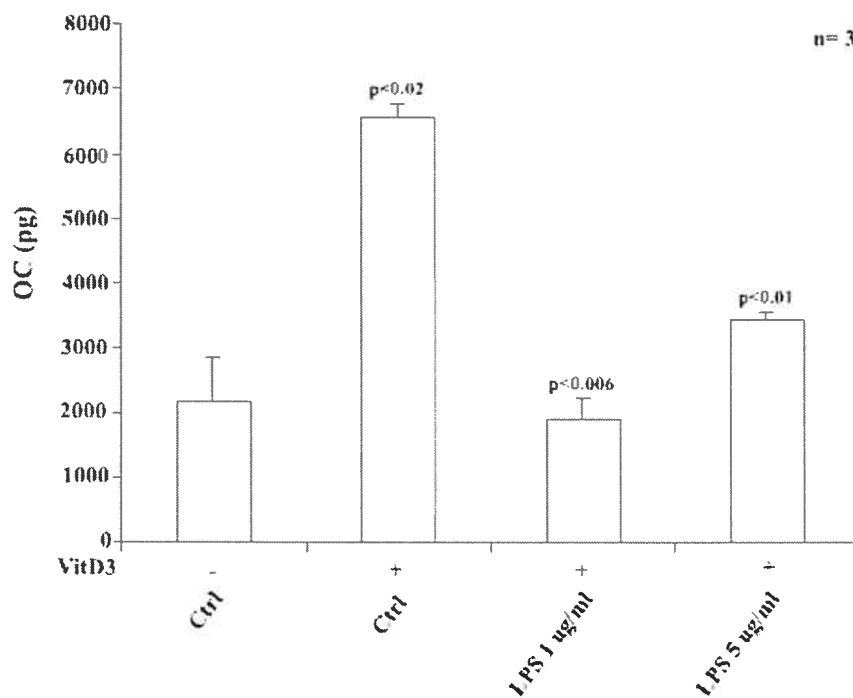


**Figure 15: Stimulation des ostéoblastes OA avec dCRD.** p vs (Ctrl – VitD3) pour le Ctrl + VitD3 et p vs (Ctrl + VitD3) pour les échantillons stimulés avec la VitD3.

### Expression de l'OC par les ostéoblastes en présence de dCRD

Étant donné qu'il aurait été possible que notre gal-3 n'aie pas été entièrement exempt de LPS suite à sa purification, nous avons voulu confirmer son effet sur l'expression de l'OC en utilisant une gal-3 commerciale garantie sans LPS. De plus, les ostéoblastes furent traités avec le CRD dans le but de déterminer l'importance du domaine N-terminal et de la dimérisation dans l'action de la gal-3 sur les ostéoblastes. Le niveau d'expression protéique de l'ostéocalcine a été étudié par EIA sur des milieux d'ostéoblastes stimulés avec la gal-3 commerciale et le CRD en présence de vitD<sub>3</sub>. Les ostéoblastes stimulés avec la gal-3 commerciale expriment l'OC à un niveau approximativement 4 fois plus bas que le contrôle et un niveau d'expression d'OC similaire à celui observé en présence de gal-3 commerciale est observé pour la plus faible dose de CRD. Comme le CRD initiait une réduction du niveau d'OC par les ostéoblastes, nous avons enlevé la séquence His-Tag pour déterminer le rôle de la dimérisation de gal-3 et l'importance du domaine CRD dans l'effet de gal-3 sur la diminution de l'expression de l'OC. Nous avons stimulé les ostéoblastes OA avec du CRD sans His-Tag (dCRD) en présence de vitD<sub>3</sub>. Le niveau d'expression de l'OC par les ostéoblastes suite à une stimulation avec le dCRD fut mesuré par EIA (figure 15). Les résultats obtenus par l'EIA ont été rapportés sur la quantité totale,

en  $\mu\text{g}$ , de protéines de chaque échantillon. Comme nous avons préalablement démontré, l'expression de l'OC est plus basse en absence de vitD<sub>3</sub>. Des doses de dCRD de 1 et 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  on légèrement augmenté la production d'OC par les ostéoblastes comparativement au contrôle avec vitD<sub>3</sub>, sans toutefois générer une augmentation significative. La dose de dCRD utilisées ne semble pas avoir d'effet sur cette légère augmentation de l'expression de l'OC.



**Figure 16 : Stimulation d'ostéoblastes avec LPS.** p vs (Ctrl – VitD<sub>3</sub>) pour le Ctrl + VitD<sub>3</sub> et p vs (Ctrl + VitD<sub>3</sub>) pour les échantillons stimulés avec la VitD<sub>3</sub>.

### Expression de l'OC par les ostéoblastes stimulés avec du LPS

Nos protéines recombinantes étant issues de cultures bactériennes, il serait possible que des LPS soient liés au CRD. Il est connu que les LPS réduisent l'expression de l'OC par les ostéoblastes. Nous avons donc tenu à vérifier l'impact des LPS sur la production d'OC par les ostéoblastes OA dans le but de comparer ces valeurs à celles obtenues avec le CRD. Un fois stimulés avec du LPS, le niveau d'expression de l'OC par les ostéoblastes fut mesuré

par EIA (figure 16). En absence de vitD<sub>3</sub>, le niveau d'expression d'ostéocalcine est très bas, soit environ le tiers du contrôle avec vitD<sub>3</sub>. L'EIA indique aussi que l'expression de l'OC diminue du tiers et de moitié en présence de LPS à 1 et 5 µg/ml, respectivement. Ce graphique représente l'expression totale de l'ostéocalcine en pg, puisque les protéines totales de ces échantillons n'étaient pas disponibles.

### **Autres manipulations**

Dans l'article publié ci-joint, les méthodes et résultats concernant l'injection intra-articulaire de gal-3, l'évaluation du score histologique et de l'enflure de l'articulation, la stimulation de chondrocytes OA par la gal-3 et la détermination, par PCR quantitatif, de l'expression de ADAMTS-5 et de MMP-3 par ces chondrocytes seront présentés en détails. Comme j'ai désiré garder le format de publication de l'article, la pagination ne concorde pas avec celle de ce mémoire.

## Research article

## Open Access

# Extracellular localization of galectin-3 has a deleterious role in joint tissues

Audrée Janelle-Montcalm<sup>1</sup>, Christelle Boileau<sup>1</sup>, Françoise Poirier<sup>2</sup>, Jean-Pierre Pelletier<sup>1</sup>,  
Mélanie Guévremont<sup>1</sup>, Nicolas Duval<sup>3</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>1</sup> and Pascal Reboul<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de Recherche en Arthrose, Centre de Recherche de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada

<sup>2</sup>Universités Paris 6 et Paris 7, Institut Jacques Monod, CNRS UMR 7592, Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

<sup>3</sup>Pavillon des Charmilles, boulevard des Laurentides, Vimont, Québec H7M 2Y3, Canada

Corresponding author: Pascal Reboul

Received: 23 Nov 2006 Revisions requested: 21 Dec 2006 Revisions received: 23 Jan 2007 Accepted: 27 Feb 2007 Published: 27 Feb 2007

*Arthritis Research & Therapy* 2007, **9**:R20 (doi:10.1186/ar2130)

This article is online at: <http://arthritis-research.com/content/9/1/R20>

© 2007 Janelle-Montcalm et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Abstract

In this study we examine the extracellular role of galectin-3 (gal-3) in joint tissues. Following intra-articular injection of gal-3 or vehicle in knee joints of mice, histological evaluation of articular cartilage and subchondral bone was performed. Further studies were then performed using human osteoarthritic (OA) chondrocytes and subchondral bone osteoblasts, in which the effect of gal-3 (0 to 10 µg/ml) was analyzed. Osteoblasts were incubated in the presence of vitamin D<sub>3</sub> (50 nM), which is an inducer of osteocalcin, encoded by an osteoblast terminal differentiation gene. Genes of interest mainly expressed in either chondrocytes or osteoblasts were analyzed with real-time RT-PCR and enzyme immunoassays. Signalling pathways regulating osteocalcin were analyzed in the presence of gal-3. Intra-articular injection of gal-3 induced knee swelling and lesions in both cartilage and subchondral bone. On human OA

chondrocytes, gal-3 at 1 µg/ml stimulated ADAMTS-5 expression in chondrocytes and, at higher concentrations (5 and 10 µg/ml), matrix metalloproteinase-3 expression. Experiments performed with osteoblasts showed a weak but bipolar effect on alkaline phosphatase expression: stimulation at 1 µg/ml or inhibition at 10 µg/ml. In the absence of vitamin D<sub>3</sub>, type I collagen alpha 1 chain expression was inhibited by 10 µg/ml of gal-3. The vitamin D<sub>3</sub> induced osteocalcin was strongly inhibited in a dose-dependent manner in the presence of gal-3, at both the mRNA and protein levels. This inhibition was mainly mediated by phosphatidylinositol-3-kinase. These findings indicate that high levels of extracellular gal-3, which could be encountered locally during the inflammatory process, have deleterious effects in both cartilage and subchondral bone tissues.

## Introduction

Osteoarthritis (OA) accounts for 40% to 60% of degenerative illnesses of the musculoskeletal system. On the whole, approximately 15% of the population suffers from OA. Of these, approximately 65% are 60 years of age and over. The high incidence of this illness is rather disturbing since its frequency increases gradually with the aging of the population.

It is well known that age is a primary risk factor for the development of OA, but the mechanisms by which aging contributes to an increased susceptibility to OA are poorly understood [1]. The end point of OA is cartilage destruction, which impairs joint movement and causes pain. In knee joints,

the cartilage destruction is associated with and/or preceded by subchondral bone alterations [2]. Joint destruction is also associated with joint inflammation, where the synovial membrane plays a key role [3]. The chronological events of these phenomena are still debated in the literature. However, because of the complexity of the disease, its initiation could occur via any of these tissues, although inflammation of the synovial membrane is less likely to be a primary cause. In OA, it would appear that both cartilage and subchondral bone are altered extracellularly [4-7]. The age-related changes in chondrocytes result in a metabolic and phenotypic decline, triggering chondrocytes to be less responsive to growth factor stimulation and more prone to catabolic stimulation. This

ADAMTS-5 = a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif; CRD = carbohydrate recognition domain; D = day; DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium; EIA = enzyme immunoassay; FBS = fetal bovine serum; Gal-3 = galectin-3; MMP = matrix metalloproteinase; OA = osteoarthritis; PBS = phosphate buffered saline; PI 3-kinase = phosphatidylinositol 3-kinase; rh-gal-3 = recombinant human gal-3.

phenomenon could be the result of biomechanical forces as well as biological sources, such as cycles of hypoxia, the presence of reactive oxygen species, accumulation of advanced glycation end products and the effects of inflammatory cytokines [8-11]. Indeed, clinically detectable joint inflammation may predict a worse radiological outcome in OA [12].

Mechanisms by which synovitis exacerbates structural damage in OA are complex. Synovitis induces alterations in chondrocyte function and in subchondral bone turnover and enhances angiogenesis [13,14]. Cytokines, such as interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ , and growth factors are mainly responsible for these processes. However, another factor, galectin-3 (gal-3), can be markedly present in OA synovial tissue during inflammatory phases, in which leukocyte infiltration occurs [15]. These findings underline the potential deleterious role of gal-3 at the pannus level, where activated macrophages, a type of cell belonging to the leukocyte population able to secrete up to 30% of their gal-3, are present [3,16,17]. This indicates that gal-3 could be found extracellularly in the joint.

The exact role of gal-3 in articular tissues is not yet known. It is a soluble animal lectin of 30 kDa that preferentially recognizes lactosamine and N-acetyllactosamine structures [18,19]. Intracellularly, gal-3 is involved in a variety of processes, including RNA splicing [20], differentiation [21], and apoptosis [22]. Extracellularly, it is involved in cell-cell [23,24] or cell-matrix interactions [25-28]. Our recent work reported the capacity of normal and OA human chondrocytes to synthesize gal-3, with an increased expression level in human OA articular cartilage [29].

In the present study, we further investigate the role of extracellular gal-3 in joint tissues. To this end, we first examined its *in vivo* effect in mice having received an intra-articular injection of gal-3, and further investigated its effect on cells from two OA articular tissues: cartilage and subchondral bone.

## Materials and methods

### Intra-articular injection of galectin-3 in mice

Six-week-old 129c/c mice were housed in wire cages in animal rooms with controlled temperature, humidity, and light cycles. Mice were allowed food and water *ad libitum*. Recombinant human gal-3 (rh-gal-3) was prepared in our laboratory and sterilized on a 0.2  $\mu$ m filter. As the amino acid sequence of rh-gal-3 shows 85% identical homology and 91% positive homology with murine gal-3, we injected rh-gal-3 into the knees of wild-type mice. Mice were distributed into 4 groups receiving 100 ng, 1  $\mu$ g or 10  $\mu$ g of gal-3 or vehicle (PBS) alone according to previous established protocols [30,31]. After being anaesthetized with isoflurane, a skin incision was performed on each knee and a single injection of gal-3 or PBS administered under the patellar ligament using a Hamilton syringe with a 26G $^{3/8}$  intradermal needle. The day of injection

was considered day 0 (D0); the animals were sacrificed 4 days after the injection. The study was performed according to the Canadian Council on Animal Care regulations and was approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal Hospital Centre.

### Knee joint swelling calculation

Animals were examined daily and knee diameter was measured using a digital calliper (model #2071M, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japan) as described by Williams and colleagues [32]. The swelling corresponded to the difference between joint diameter measured every day and joint diameter prior to the injection.

### Cartilage histological grading

Histological evaluation was performed on the sagittal sections of the mouse knees removed at D4. Specimens were dissected, fixed in TissuFix #2 (Laboratoires Gilles Chaput, Montreal, QC, Canada), decalcified in RDO Rapid Decalcifier for bone (Apex Engineering, Plainfield, IL, USA), and embedded in paraffin. Serial sections (5  $\mu$ m) were stained with safranin O and toluidine blue. The modifications in cartilage and subchondral bone were graded on a scale of 0 to 20 by two blinded, independent observers using a histological scale modified from Mankin and colleagues [33]. This scale was used to evaluate the severity of modifications based on the loss of staining with toluidine blue (scale 0 to 4), cellular changes (scale 0 to 4), surface/structural changes in cartilage (scale 0 to 5), structure of the deep zone of cartilage (scale 0 to 4), and subchondral bone remodelling (scale 0 to 3). Scoring was based on the most severe histological changes within each cartilage and subchondral bone section.

### Subchondral bone morphometry

The sections (5  $\mu$ m) of each specimen were subjected to safranin O staining, as previously described [34]. A Leica DMLS microscope (Leica, Weitzlar, Germany) connected to a personal computer (Pentium III, using Image J software, V.1.27, NIH, USA) was used to perform the subchondral bone morphometry analysis. The subchondral bone surface ( $\mu$ m) was measured on each slide in two 500  $\mu$ m  $\times$  250  $\mu$ m boxes, using as the upper limit, the calcified cartilage/subchondral bone junction as previously described [34]. Two measurements were done and averaged for each section.

### Human osteoarthritis specimens

Femoral condyles and tibial plateaus were obtained from 15 OA patients (9 female and 6 male; aged 67  $\pm$  9 years) following total knee arthroplasty. All patients were evaluated by a certified rheumatologist and, based on the criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA [35], were diagnosed as having OA. This procedure was approved by the Ethics Committee of the University of Montreal Hospital Centre.

### Human chondrocyte culture

Chondrocytes were released from the articular cartilage by sequential enzymatic digestion at 37°C, as previously described [36,37] and cultured in DMEM (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% FBS (Invitrogen) and an antibiotic mixture (100 units/ml penicillin base, 100 µg/ml streptomycin base; Invitrogen) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Only first-passage cultured OA chondrocytes were used in the study. OA chondrocytes were seeded at  $1 \times 10^5$  cells in 12 well plates in DMEM containing 10% FBS for 48 h; the medium was then replaced for 24 h by DMEM containing 0.5% FBS, after which the cells were incubated for 24 h in fresh media containing 0.5% FBS in the absence or presence of rh-gal-3 (0 to 10 µg/ml).

### Subchondral bone osteoblast culture

The overlying cartilage was removed from the tibial plateaus, and the trabecular bone tissue was dissected from the subchondral bone plate. Primary subchondral osteoblasts were released as previously described [38]. Briefly, subchondral bone samples were cut into small pieces of 2 mm<sup>2</sup> before sequential digestion in the presence of 1 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in DMEM without serum at 37°C for 30, 30, and 240 minutes. After being washed with the same medium, the digested subchondral bone pieces were cultured in DMEM containing 10% FBS. This medium was replaced every two days until cells were observed in the petri dishes. At confluence, cells were passaged once in 12- or 24-well plates in DMEM containing 10% FBS. Experiments were performed in DMEM containing 0.5% of charcoal FBS with or without 50 nM 1,25 [OH]<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (1,25-dihydroxycholecalciferol; vitamin D<sub>3</sub>) in combination or not with gal-3. To evaluate signalling pathways involved in vitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteocalcin production that are inhibited by gal-3, cells were pre-incubated for 2 h with specific inhibitors and then incubated for 22 h in the presence of the inhibitors and

vitamin D<sub>3</sub> in combination or not with gal-3. The inhibitors used were KT5720 (inhibitor of protein kinase A; final concentration 2 µM), KT5823 (inhibitor of protein kinase G; final concentration 2 µM), Genistein (broad inhibitor of tyrosine kinase; final concentration 20 µM), Taxifolin (an antioxidant flavonoid; final concentration 1 µM), wortmannin (inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase); final concentration 250 nM), PD98059 (inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK-1) activation; final concentration 10 µM), and SB202190 (inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase; final concentration 2 µM). All inhibitors were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

### Real time RT-PCR

RNA extraction and real time RT-PCR were performed as previously described [29]. Primers for the genes encoding a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS)-5 (aggrecanase-2), matrix metalloproteinase (MMP)-3 (stromelysin), osteocalcin, alkaline phosphatase and type I collagen α1 chain were synthesized by Invitrogen (Table 1). Data analysis was carried out using the Gene Amp 5700 Sequence Detector System software (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) and values normalized to the ribosomal subunit 18S. Specific primers for type I collagen α1 chain were designed using Primer3 software [39].

### Osteocalcin determination

The assay measured only intact human osteocalcin and was performed on human osteoblast-conditioned media using a specific enzyme immunoassay (EIA) kit with a sensitivity of 0.5 ng/ml (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA).

### Protein determination

Cells were lysed in 0.5% sodium dodecylsulfate and proteins quantified with the bicinchoninic acid assay [40].

**Table 1**

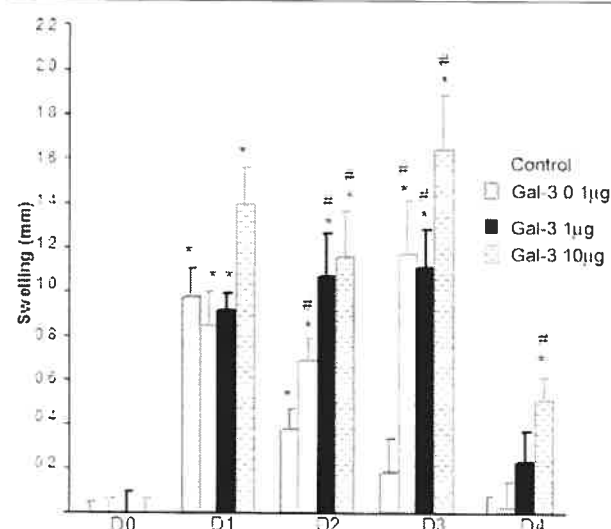
#### Primers used for RT-PCR

Amplified gene product	Primers	Base pairs	Reference
ADAMTS-5	S: GGCATCATTCATGTGACAC AS: GCATCGTAGGTCTGTCCTG	364	
MMP-3	S: GAAAGTCTGGGAAGAGGTGACTCCAC AS: CAGTGTTGGCTGAGTGAAAGAGACCC	284	
Osteocalcin	S: CATGAGAGCCCTCAC AS: AGAGCGACACCCCTAGAC	310	[48]
Alkaline phosphatase	S: TGCAGTACGAGCTGAACAG AS: TGAAGACGTGGGAATGGTC	267	
Type I collagen α1 chain	S: CCGAAGGTTCCCTGGACGA AS: CGCCCTGTTGCCTGTCTCA	252	
18S	S: GAATCAGGGTTCGATTCCG AS: CCAAGATCCAACCTACGAGC	279	[29]

S, sense; AS, antisense.



Figure 1



Mouse knee swelling measurement. Galectin-3 (gal-3) was injected in both knees. Animals were examined daily and knee diameter measured using a digital calliper as described in Materials and methods. The swelling corresponded to the difference between joint diameter measured every day and joint diameter prior to the injection (D0). D0 was given the value of 0. Control (Ctl): injection of PBS. Each group contained four animals. \**p* versus same conditions as D0; #*p* versus control of the corresponding day.

### Statistical analysis

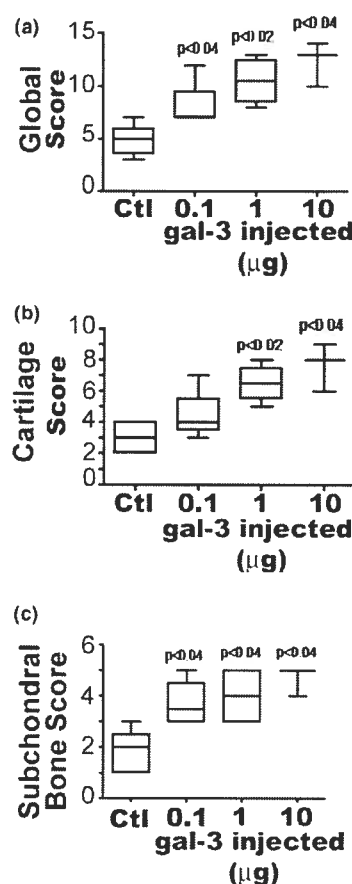
Data are expressed as mean  $\pm$  SEM or median (range). Statistical analyses were the Mann-Whitney U and the two-tailed Student's *t*-tests for animal experiments and cell culture, respectively. Results of *p* < 0.05 were considered significant.

## Results

### Intra-articular injection of galectin-3

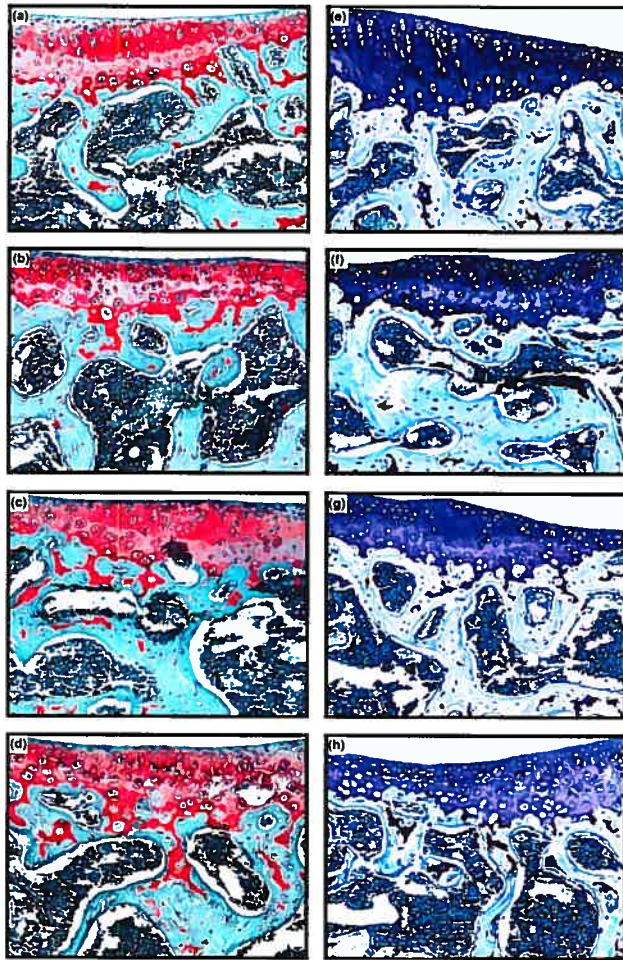
As Ohshima and colleagues [15] showed that gal-3 was markedly present in OA synovial tissues during the inflammatory phase and could be recovered in the synovial fluid, we explored the potential extracellular role of gal-3. We injected gal-3 (0.1, 1, and 10  $\mu$ g) into the knee joints of mice. To evaluate the potential role of gal-3 in the inflammation process we first determined if this molecule induces joint swelling. Data show that the vehicle alone (control) induced a joint swelling at D1 (*p*  $\leq$  0.0002 versus D0) (Figure 1). Although joint swelling at D2 was significantly lower compared to D1 (*p* < 0.005), a significant difference was still seen when D2 was compared to D0 (*p* < 0.004). Values gradually returned to the basal conditions. Gal-3 exacerbated and extended the swelling; thus, at D2, gal-3 injections of 0.1, 1, and 10  $\mu$ g significantly induced higher swelling than the vehicle alone (*p* < 0.05, *p* < 0.004 and *p* < 0.002, respectively). This effect was sustained the third day post-injection (*p* < 0.006 for 0.1  $\mu$ g, *p* < 0.002 for 1  $\mu$ g, *p* < 0.0001 for 10  $\mu$ g). Finally, at D4, values tended to return to those of the control group, although gal-3-induced joint swelling was still statistically significant (*p* < 0.006) with

Figure 2



Histological score for mice four days after intra-articular galectin-3 (gal-3) injection. (a) Total score, (b) cartilage score and (c) bone histomorphometric score. Data are expressed as median and (range) and are presented in box plot, where the boxes represent the 1st and 3rd quartiles, the line within the box represents the median, and the lines outside the box represent the spread of the values. Control (Ctl): mice injected with PBS. \**P* versus control group; *n* = four animals per group.

Furthermore, we investigated the effect of gal-3 on cartilage and subchondral bone using histological means. The global histological score (median and (range)) in the control group was 5.0 (3.5 to 6.0) whereas it reached 9.5 (7.0 to 12.5) (*p* < 0.04 versus control), 10.5 (8.5 to 12.5) (*p* < 0.02 versus control) and 13 (10.0 to 15.0) (*p* < 0.04 versus control) in the gal-3-injected group with 0.1, 1, and 10  $\mu$ g gal-3, respectively (Figure 2a). The cartilage score in the control group was 3.0 (2.0 to 4.0) whereas it reached 4.0 (3.5 to 5.5), 6.5 (5.5 to 7.5) (*p* < 0.02 versus control) and 8 (*p* < 0.04 versus control) in the gal-3-injected group with 0.1, 1, and 10  $\mu$ g gal-3, respectively (Figure 2b). The subchondral score in the control group was 2.0 (1.0 to 2.5) whereas it reached 3.5 (3.0 to 4.5) (*p* < 0.04 versus control), 4.0 (3.0 to 5.0) (*p* < 0.04 versus control) and 5 (*p* < 0.04 versus control) in the gal-3-injected group with 0.1, 1, and 10  $\mu$ g gal-3, respectively (Figure 2c). Therefore, both

**Figure 3**

Representative histological sections of specimens from mice stained with (a-d) safranin O or (e-h) toluidine blue (magnification  $\times 100$ ). Control group (a,e). Mice were injected with 0.1  $\mu\text{g}$  (b,f), 1  $\mu\text{g}$  (c,g), or 10  $\mu\text{g}$  (d,h) galectin-3.

the cartilage parameters (structure/surface, cellularity, and toluidine blue staining) and the subchondral bone surface were modified by the gal-3 injection (Figure 3). These modifications are illustrated in Figure 3, which shows changes in the surface, in cellularity and remodelling of the deep layers in the presence of gal-3 (left panel (b-d)) compared to the control group. Destaining and modification of cell columns were also noticed in the presence of gal-3 (left panel (f-h)) compared to the control group.

#### Effects of galectin-3 on chondrocytes and osteoblasts

##### Effect of galectin-3 on ADAMTS-5 and MMP-3 in human OA chondrocytes

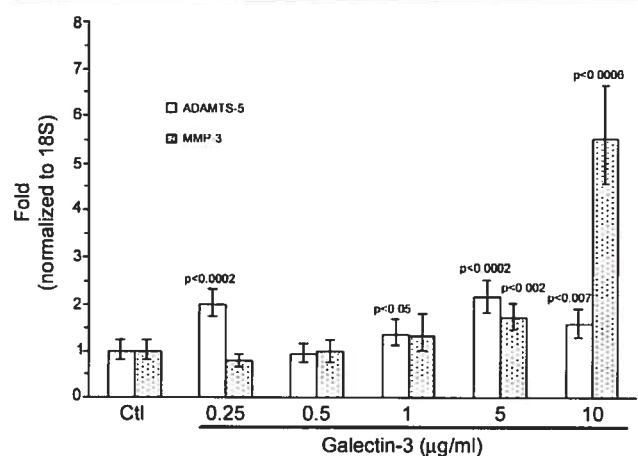
*In vivo* data strongly suggest that extracellular gal-3 affects both chondrocytes and osteoblasts. We therefore further explored the effects of gal-3 on human OA cells and examined

enzymes and markers of these cells. For chondrocytes, two major enzyme systems were evaluated: ADAMTS-5 and MMP-3. Data show that human OA chondrocytes incubated with rh-gal-3 for 24 h increased ADAMTS-5 expression in a biphasic mode. Indeed, it is interesting to note that this gene is very sensitive to gal-3 since a concentration as low as 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  is sufficient to significantly enhance its expression. Another peak of stimulation was obtained with a concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Figure 4). MMP-3 expression was only slightly induced at low concentration and significance was reached at 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  with a major increase obtained at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Figure 4).

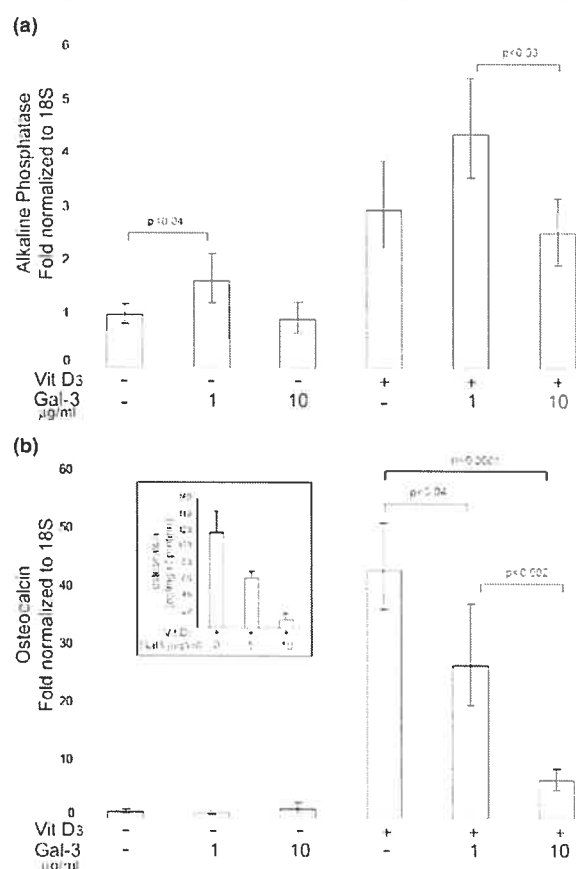
##### Effects of galectin-3 on osteoblastic markers in human OA subchondral bone osteoblasts

The effects of gal-3 on human osteoblasts were evaluated in the presence or absence of vitamin D<sub>3</sub>, which allows the terminal differentiation of these cells. Alkaline phosphatase expression was increased with gal-3 at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $p < 0.04$ ), but not at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Figure 5a). In contrast, the latter concentration triggered significantly lower alkaline phosphatase expression than 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $p < 0.04$ ). Alkaline phosphatase, which is upregulated by vitamin D<sub>3</sub>, tended to be increased with gal-3 at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $p < 0.07$ ). A significant difference in alkaline phosphatase expression was found between osteoblasts treated with vitamin D<sub>3</sub> in the presence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gal-3 and vitamin D<sub>3</sub> in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gal-3 ( $p < 0.03$ ).

As previously described, in the absence of vitamin D<sub>3</sub>, osteocalcin expression was maintained at a minimal level, and gal-3 had no effect on osteocalcin expression (Figure 5b). In contrast, in the presence of vitamin D<sub>3</sub>, gal-3 induced a dose-dependent inhibition of osteocalcin expression. Indeed, vitamin D<sub>3</sub> alone stimulated a 43-fold increase in osteocalcin

**Figure 4**

Effects of exogenous galectin-3 (gal-3) on human osteoarthritis chondrocytes. Chondrocytes were treated with increasing concentrations of recombinant human gal-3. Both ADAMTS-5 and matrix metalloproteinase (MMP)-3 expression were analyzed by real time RT-PCR. *P* versus control (Ctl);  $n = 5$ .

**Figure 5**

Effects of exogenous galectin-3 (gal-3) on markers of subchondral bone osteoblasts. Osteoblasts were treated with 1 or 10 µg/ml of recombinant human gal-3 in the presence or absence of vitamin D<sub>3</sub>. Both (a) alkaline phosphatase and (b) osteocalcin expression were analyzed by real time RT-PCR. Insert illustrates the protein level of osteocalcin. *N* = 4.

expression compared to the basal level, whereas the addition of either 1 µg/ml gal-3 or 10 µg/ml gal-3 with vitamin D<sub>3</sub> induced osteocalcin expression to only 26.5 ( $p < 0.04$ ) and 6.5 ( $p < 0.0001$ ) times the basal level, respectively. These results were confirmed at the protein level by analyzing osteocalcin concentration in conditioned media using an EIA. Osteocalcin production was inhibited by around 40% and 85% at gal-3 concentrations of 1 and 10 µg/ml, respectively (Figure 5b, insert). We verified the inhibition of osteocalcin production with a commercially available rh-gal-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Results obtained from these experiments were  $138.7 \pm 21.2$  (mean  $\pm$  SEM; ng/mg protein;  $n = 3$ ) for osteoblasts treated with vitamin D<sub>3</sub> alone,  $67.6 \pm 7.9$  for those treated with 1 µg/ml rh-gal-3 in the presence of vitamin D<sub>3</sub> and  $2.4 \pm 0.9$  for cells treated with 10 µg/ml rh-gal-3 in the presence of vitamin D<sub>3</sub>. In addition, we made a truncated isoform of gal-3 (Gly108 to Ile249) corresponding to the carbohydrate recognition domain (CRD). This truncated isoform is known to

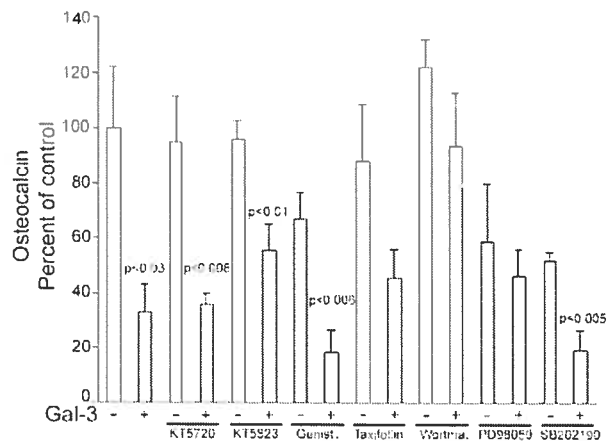
be incapable of multimerizing and it is unable to reproduce the effects of whole gal-3. Results obtained with an EIA were  $130.2 \pm 16.5$  (mean  $\pm$  SEM; ng/mg protein;  $n = 7$ ) for osteoblasts treated with vitamin D<sub>3</sub> alone,  $158.5 \pm 22.6$  for those treated with 1 µg/ml CRD in the presence of vitamin D<sub>3</sub> and  $163.4 \pm 26.1$  for those treated with 5 µg/ml CRD in the presence of vitamin D<sub>3</sub>. As expected, CRD was not able to down-regulate the osteocalcin production.

As 10 µg/ml gal-3 almost entirely inhibited osteocalcin production, we further examined the signalling cascades of gal-3 inhibition of vitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteocalcin production with 5 µg/ml gal-3, which resulted in an inhibitory effect closer to 50% (Figure 6). Vitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteocalcin production tended to be inhibited by genistein (35%) and SB202190 (40%), indicating that tyrosine kinases and p38 mitogen-activated protein kinase may be slightly involved (Figure 6). However, the addition of gal-3 in the presence of these inhibitors still induced further inhibition, which was statistically significant ( $p < 0.006$  and  $p < 0.005$ , respectively), indicating that gal-3 did not induce these pathways. The combination of gal-3 with either KT5720 or KT5823 also significantly inhibited osteocalcin production compared to their respective controls ( $p < 0.008$  and  $p < 0.01$ , respectively), indicating that neither protein kinase A nor protein kinase G are involved in gal-3-inhibited osteocalcin production. This result was confirmed by the fact that gal-3 alone and gal-3 in the presence of KT5823 did not produce results with a significant difference. In contrast, PD98059 prevented further inhibition of osteocalcin production by gal-3. This result indicates that Erk1/Erk2 kinases are also involved to some extent in gal-3 signalling transduction. Taxifolin, an antioxidant flavonoid, also seemed to prevent gal-3 inhibition of osteocalcin production, but this inhibitor had the weakest effect. The most spectacular result was obtained with an inhibitor of PI 3-kinase, wortmannin, which totally prevented the inhibition of osteocalcin by gal-3.

As type I collagen is the most abundant protein of the osteoid, we finally investigated whether gal-3 affects expression of the type I collagen  $\alpha 1$  chain in subchondral bone osteoblasts. In the absence of vitamin D<sub>3</sub>, 10 µg/ml of gal-3 inhibited 50% of type I collagen  $\alpha 1$  chain expression ( $p < 0.02$ ) but this inhibitory effect was partly reversed by vitamin D<sub>3</sub> (Figure 7).

## Discussion

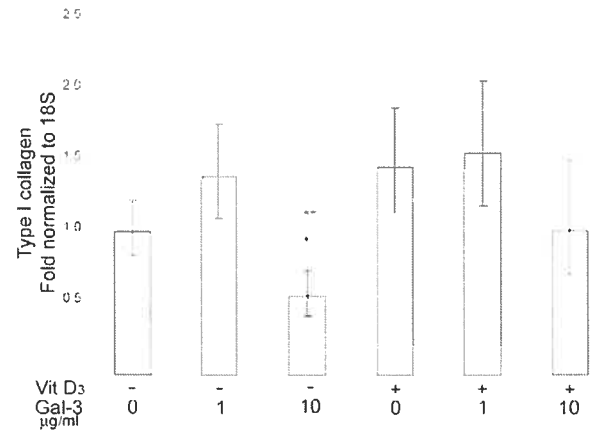
In the present study, we show that extracellular gal-3 induced swelling and OA-like lesions in the knee joints of mice. These findings were confirmed by the experiments in which we demonstrated in human OA chondrocytes that gal-3 stimulated the expression of ADAMTS-5 and MMP-3, the main enzymes involved in proteoglycan degradation in cartilage. Furthermore, using human osteoblasts, we showed that gal-3 inhibited osteocalcin production, which is encoded by the most specific and latest gene expressed by differentiated osteoblasts.

**Figure 6**

Signalling pathways of inhibition by galectin-3 (gal-3) of vitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteocalcin production. Osteoblasts were treated with 5 µg/ml of recombinant human gal-3 in the presence of vitamin D<sub>3</sub> and osteocalcin was determined. Inhibitor concentrations were: KT5720, 2 µM; KT5823, 2 µM; Genistein (Genist.), 1 µM; Taxifolin, 1 µM; wortmannin (Wortma.), 250 nM; PD98059, 10 µM; and SB202190, 2 µM. \**P* versus the autologous control; *n* = 5.

Results obtained by Ohshima and colleagues [15] demonstrated that intra-articular production of gal-3 could occur in joints even during OA, and particularly during inflammatory phases. Very often, these phases lead to hyperplasia of the synovium, which may invade the joint space and adhere to cartilage, generating a pannus. This pannus is composed of very active cells such as leukocytes and, most importantly, macrophages, which are able to secrete high levels of gal-3 when they are activated. Therefore, we injected gal-3 into the knee joints of mice and evaluated the structural changes. We found that gal-3 induced a swelling that was sustained compared to injection of PBS alone. Moreover, gal-3 injection generated lesions that affected both cartilage and subchondral bone tissue.

It is interesting to note that two major enzymes responsible for proteoglycan degradation were stimulated by gal-3. This finding corroborates the *in vivo* data, in which cartilage presented with both alterations and fainter staining with toluidine blue in gal-3 injected mice. However, not all MMPs were stimulated by gal-3 in chondrocytes, since collagenase-3 (MMP-13) was unaffected (data not shown). In addition, the level of tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1), a natural protein inhibitor produced by chondrocytes, also remained stable (data not shown). We show that ADAMTS-5 was more sensitive than MMP-3 to gal-3, since its expression was stimulated with very low concentrations of gal-3, unlike MMP-3, which required higher concentrations for stimulation. The regulation of ADAMTS-5 is crucial since it was recently demonstrated by two independent groups (using knock-out mouse models) that ADAMTS-5 is the major aggrecanase responsible for prote-

**Figure 7**

Effects of exogenous galectin-3 (gal-3) on type I collagen expression in osteoblasts. Osteoblasts were treated with 1 or 10 µg/ml of recombinant human gal-3 in the presence or not of vitamin D<sub>3</sub>. Collagen type I α1 chain expression was analyzed by real time RT-PCR. \**P* versus control (Ctl; without vitamin D<sub>3</sub> or gal-3); \*\**p* versus 1 µg gal-3 alone; *n* = 4.

oglycan degradation in cartilage destruction [41,42]. On the other hand, we so far have no explanation for the rebound phenomenon observed for ADAMTS-5 stimulation with 1 µg/ml gal-3.

Gal-3 not only modulated chondrocyte-expressed genes but also those of osteoblasts. More particularly, production of osteocalcin, which is an osteoblastic marker [43], was strongly inhibited by gal-3. Furthermore, the multimerization of gal-3 is needed to induce this effect since the CRD, which is a truncated isoform of gal-3 lacking this property, has no effect. The membranous target recognized by gal-3 is still unknown in osteoblasts. However, among other targets, gal-3 is able to bind integrin β1. Interestingly, a recent study reported that the downregulation of integrin β1 with either small interfering RNA or blocking antibodies decreased the vitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteocalcin level [44]. One hypothesis is that gal-3 may act, at least partially, by blocking integrin β1 at the osteoblast surface. Among different cascades of regulation involved in the inhibition of vitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteocalcin levels, the PI 3-kinase appears to be a key enzyme. This could be related to the implication of integrins, since it has recently been shown that several biological functions of osteoblasts are regulated via the integrin/PI 3-kinase pathway [45,46].

Unlike osteocalcin, type I collagen α1 chain expression was downregulated only with a high gal-3 concentration. However, vitamin D<sub>3</sub> prevented the inhibition of type I collagen expression. This latter finding raised the potential role of gal-3 in preventing osteoid matrix formation during the inflammatory process, particularly in individuals with low or depleted levels

of vitamin D<sub>3</sub> since it has been shown that vitamin D<sub>3</sub> analogues have immunomodulatory effects [47].

## Conclusion

The presence of extracellular gal-3 in the vicinity of chondrocytes and osteoblasts causes deleterious effects by both downregulating the anabolic processes and upregulating the catabolic processes. In fact, this factor may participate in cartilage destruction and subchondral bone erosion, particularly during the highly inflammatory phases of OA.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

AJM contributed to the *in vitro* study, analyzed the data and drafted the manuscript. CB participated to the animal study design, analyzed the data and drafted the manuscript. MG participated in the *in vitro* study. FP, JPP, ND, JMP, PR contributed to the study design. FP, JPP, JMP, PR contributed to the revision of the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors thank Virginia Wallis for her assistance in manuscript preparation and Dr Ginette Tardif for designing some of the primers. Christelle Boileau is a recipient of a postdoctoral award from the Canadian Institutes of Health Research/R&D. Françoise Poirier is a recipient of a Ligue Nationale contre le Cancer grant. Pascal Reboul is a recipient of the New Investigator Award from the Canadian Arthritis Society. This study was supported by grant TAS 01/0033 from the Canadian Arthritis Society and by grant MOP-64401 from the Canadian Institutes of Health Research (PReboul).

## References

- Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im HJ, Bursch LS, Yan SD: **Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:2376-2385.
- Burr DB: **The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis.** *J Rheumatol Suppl* 2004, **70**:77-80.
- Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T: **Subtyping of osteoarthritic synoviotherapy.** *Clin Exp Rheumatol* 2002, **20**:633-640.
- Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lefebvre FP, Tekoppele JM: **Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen.** *Biochem J* 2000, **350**:381-387.
- DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, Jacobs KM, Van El B, Van Roermund PM, Bank RA, Bijlsma JW, Tekoppele JM, Lefebvre FP: **Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:1207-1215.
- Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ: **Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip.** *Br J Rheumatol* 1997, **36**:16-19.
- Carrington JL: **Aging bone and cartilage: cross-cutting issues.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **328**:700-708.
- Loeser RF: **Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:1357-1360.
- Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schunke M: **Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury.** *Ann Anat* 2005, **187**:473-485.
- DeGroot J, Verzijl N, Bank RA, Lefebvre FP, Bijlsma JW, Tekoppele JM: **Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:1003-1009.
- Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, Brau-Benjamin O, Maroudas A, Bank RA, Mizrahi J, Schalkwijk CG, Thorpe SR, Baynes JW, et al.: **Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**:114-123.
- Ledingham J, Regan M, Jones A, Doherty M: **Factors affecting radiographic progression of knee osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 1995, **54**:53-58.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB: **Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**:1237-1247.
- Walsh DA: **Angiogenesis in osteoarthritis and spondylosis: successful repair with undesirable outcomes.** *Curr Opin Rheumatol* 2004, **16**:609-615.
- Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu FT, Gay S, Neidhart M: **Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:2788-2795.
- Sato S, Hughes RC: **Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages.** *J Biol Chem* 1994, **269**:4424-4430.
- He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA: **The synthesis of interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human OA synovial membrane explants: Interactions with anti-inflammatory cytokines.** *J Rheumatol* 2002, **29**:546-553.
- Raimond J, Zimonjic DB, Mignon C, Matter M, Popescu NC, MonSIGNY M, Legrand A: **Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21-22.** *Mamm Genome* 1997, **8**:706-707.
- Kadrofske MM, Openo KP, Wang JL: **The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter.** *Arch Biochem Biophys* 1998, **349**:7-20.
- Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ: **Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:1213-1217.
- Bao Q, Hughes RC: **Galectin-3 expression and effects on cyst enlargement and tubulogenesis in kidney epithelial MDCK cells cultured in three-dimensional matrices in vitro.** *J Cell Sci* 1995, **108**:2791-2800.
- Yang RY, Hsu DK, Liu FT: **Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:6737-6742.
- Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A: **Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells.** *Cancer Res* 1999, **59**:4148-4154.
- Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A: **Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family.** *Cancer Res* 1997, **57**:5272-5276.
- van den Brule FA, Buicu C, Sobel ME, Liu FT, Castronovo V: **Galectin-3, a laminin binding protein, fails to modulate adhesion of human melanoma cells to laminin.** *Neoplasia* 1995, **4**:215-219.
- Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P: **Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **246**:788-791.
- Ochieng J, Warfield P, Green-Jarvis B, Fentie I: **Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin.** *J Cell Biochem* 1999, **75**:505-514.
- Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P: **Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1379**:97-106.
- Guéremont M, Martel-Pelletier J, Boileau C, Liu FT, Richard M, Fernandes JC, Pelletier JP, Reboul P: **Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**:636-643.
- van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB: **Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections.** *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8**:25-33.



31. Jin T, Tarkowski A, Carmeliet P, Bokarewa M: **Urokinase, a constitutive component of the inflamed synovial fluid, induces arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2003, **5**:R9-R17.
32. Williams AS, Mizuno M, Richards PJ, Holt DS, Morgan BP: **Deletion of the gene encoding CD59a in mice increases disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:3035-3044.
33. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data.** *J Bone Joint Surg Am* 1971, **53**:523-537.
34. Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, Boily M, Lajeunesse D, Reboul P, Laufer S, Martel-Pelletier J: **The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K.** *Bone* 2004, **34**:527-538.
35. Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al.: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**:1039-1049.
36. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Benderdour M, Ranger P, Bottaro DP, Martel-Pelletier J: **Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**:73-84.
37. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis.** *J Clin Invest* 1996, **97**:2011-2019.
38. Guévremont M, Martel-Pelletier J, Massicotte F, Tardif G, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D, Reboul P: **Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF. Potential implication of osteoblasts for the HGF presence in cartilage.** *J Bone Miner Res* 2003, **18**:1073-1081.
39. **Primer3** [[http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)]
40. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**:76-85.
41. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, et al.: **ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro*.** *Nature* 2005, **434**:648-652.
42. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, et al.: **Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis.** *Nature* 2005, **434**:644-648.
43. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S: **Circulating osteoblast-lineage cells in humans.** *N Engl J Med* 2005, **352**:1959-1966.
44. Wang L, Zhao G, Olivares-Navarrete R, Bell BF, Wieland M, Cochran DL, Schwartz Z, Boyan BD: **Integrin beta1 silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D3.** *Biomaterials* 2006, **27**:3716-3735.
45. Tang CH, Yang RS, Huang TH, Lu DY, Chuang WJ, Huang TF, Fu WM: **Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts.** *Mol Pharmacol* 2006, **69**:2047-2057.
46. Grigoriou V, Shapiro IM, Cavalcanti-Adam EA, Composto RJ, Ducheyne P, Adams CS: **Apoptosis and survival of osteoblast-like cells are regulated by surface attachment.** *J Biol Chem* 2005, **280**:1733-1739.
47. Andjelkovic Z, Vojinovic J, Pejnovic N, Popovic M, Dujic A, Mitrovic D, Pavlica L, Stefanovic D: **Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1 alpha (OH) D3 in rheumatoid arthritis patients.** *Clin Exp Rheumatol* 1999, **17**:453-456.
48. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL: **Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow.** *J Bone Miner Res* 1996, **11**:312-324.

## **DISCUSSION**

Premièrement, les résultats obtenus suite à l'injection de la gal-3 au niveau de l'articulation suggèrent qu'elle est capable d'endommager l'articulation. En effet, une augmentation notable de l'enflure de l'articulation suite à une injection de la gal-3 ainsi qu'une dégénération au niveau du cartilage et de l'os sous-chondral font foi de cette dégradation initiée par la gal-3. Par conséquent, la gal-3 extracellulaire peut initier des dommages au niveau de l'articulation. Bien que la concentration de la gal-3 dans le fluide synovial ne soit pas significativement plus élevée que la normale, la sécrétion localisée de la gal-3 au niveau du pannus pourrait être responsable de la dégénération de l'articulation lors de l'OA. Les résultats obtenus par PCR quantitatif démontrent que les chondrocytes, en présence de la gal-3, expriment plus d'ADAMTS-5 et de MMP-3, deux enzymes jouant un rôle clé dans la dégradation des protéoglycanes. Il serait donc possible que la dégradation de l'articulation observée chez les souris soit due à une augmentation de l'expression de ces enzymes par les chondrocytes. Aucune explication n'a été trouvée quant à la réponse biphasique observée pour ADAMTS-5. Toutefois, il est intéressant de noter que l'expression d'ADAMTS-5 est beaucoup sensible à la présence de la gal-3 que MMP-3, qui présente peu de changement au niveau de son expression avant d'atteindre la stimulation par 10 µg/ml de galectine-3. Toutefois, comme la gal-3 pourrait être présente à de fortes concentrations au niveau du pannus, possiblement à la suite d'une sécrétion par les macrophages, la concentration locale de la gal-3 pourrait être suffisante pour augmenter l'expression de MMP-3.

La stimulation d'ostéoblastes OA de l'os sous-chondral avec de la gal-3 en présence ou absence de vitamine D<sub>3</sub> a modifié l'expression de facteurs ostéoblastiques normalement présents. Entre autre, l'OC n'est pas exprimée par les ostéoblastes en absence de vitD<sub>3</sub>. De plus, comme les populations nordiques voient leur apport en vitD<sub>3</sub> diminuer en hiver, faute d'exposition lumineuse adéquate, il est intéressant d'observer les effets de la gal-3 en présence et absence de vitD<sub>3</sub>. La phosphatase alcaline (AP), qui est importante pour la minéralisation de l'os, voit son expression augmenter sous de faibles concentrations de gal-3 et retourner à un niveau légèrement plus bas que le contrôle avec une concentration de gal-3 plus élevée. L'OPG voit aussi son expression augmenter en présence de la gal-3, tout

comme RANKL, bien que ces résultats ne soient pas significatifs. Il est important de noter que le ratio RANKL/OPG semble augmenter de façon dose-dépendante suite à une stimulation avec la gal-3. En tenant compte des changements prenant place pour l'AP, RANKL et OPG, il est possible qu'à de faibles doses, la gal-3 initie une modification du phénotype de l'os sous-chondral et augmente l'expression de RANKL. L'os tente alors en vain de contrer la dégénération en produisant des facteurs anaboliques comme OPG et AP. Toutefois, comme le ratio RANKL/OPG est positif, il est fort probable que la résorption l'emporte sur la régénération. De plus fortes concentrations de la gal-3 augmentent encore plus l'expression de RANKL, ce qui augmente le ratio RANKL/OPG et favorise la résorption osseuse. Si, selon notre hypothèse, la gal-3 est sécrétée de façon locale au niveau du pannus, il serait possible que de fortes concentrations de la gal-3 agissent sur l'os sous-chondral et le modifient. Comme la résorption osseuse semble serait augmentée chez les patients OA (*Stewart et al., 1999*), il serait possible que la gal-3 joue un rôle dans ce processus.

La modification du phénotype ostéoblastique est aussi visible sur l'expression de l'OC. Impliquée de la minéralisation, l'OC voit son niveau d'expression d'ARN messager et de protéines réduit drastiquement de façon dose-dépendante suite à une stimulation avec la gal-3. Il est important de souligner que les ostéoblastes incubés avec la gal-3 en absence de vitD<sub>3</sub> présentent une très faible expression d'ARNm de l'OC, qui est un marqueur des ostéoblastes. Vu la réduction du niveau d'expression d'OC en présence de la gal-3, il serait possible que la gal-3 induise une dédifférentiation des ostéoblastes. En ajoutant différents inhibiteurs lors d'une stimulation avec la gal-3, il a été possible d'observer d'étudier les potentielles voies utilisées par la gal-3 lors de son inhibition de l'expression de l'OC. Comme la réduction de l'expression de l'OC ne fut pas renversée par les inhibiteurs KT5720, KT5823, génisteine et SB202190, il semble que l'inhibition ne passe pas par les voies PKA, PKG, tyrosine kinase, ni par p38. La taxifolline, un anti-oxydant, a généré une légère amélioration quant à la production d'OC en présence de la gal-3, ce qui laisse suggérer un rôle mineur dans ce processus. Par contre, la wortmanine, bien que ne renversant pas entièrement l'inhibition générée par la gal-3, présente une inhibition de l'OC de seulement 17%, contrairement à 50% pour le contrôle. Il est donc possible que



l'effet de la gal-3 sur l'ostéocalcine soit dépendant en partie d'une voie PI3 kinase. De plus, le PD98059, bien que diminuant l'expression de l'OC en absence de la gal-3, peut renverser partiellement l'inhibition de l'expression de l'OC. Ainsi, Erk 1/2 pourraient être impliquées dans l'effet généré par la gal-3 sur l'expression de l'OC par les ostéoblastes. Le collagène de type I étant le principal constituant de la matrice osseuse, son expression fut aussi observée. En présence et en absence de vitamine D<sub>3</sub>, aucune différence significative ne fut observée concernant l'expression du collagène type I.

Pour déterminer l'importance de la dimérisation dans le rôle de la gal-3 sur les ostéoblastes, une protéine recombinante comprenant seulement le domaine CRD fut générée. Selon Gong *et al.*, les 11 premiers acides aminés de la séquence N-terminale sont important dans la dimérisation de la gal-3. Ainsi, il aurait été possible qu'une délétion de ces mêmes 11 acides aminés soit suffisante pour empêcher l'effet de la gal-3 sur les ostéoblastes. Toutefois, comme la gal-3 peut être coupée par les MMP-2, -9 et la collagénase-3, la délétion complète de la séquence N-terminale et du domaine semblable au collagène fut faite pour éviter une potentielle dégradation de la gal-3 par ces molécules potentiellement sécrétées par nos chondrocytes. Comme le domaine N-terminal est impliqué dans la dimérisation, le CRD ne devait pas se dimériser. Contre toute attente, le CRD réduisit la production d'OC par les ostéoblastes. Notre hypothèse était que la gal-3 devait se dimériser pour produire son effet sur l'expression de l'OC par les ostéoblastes. Par conséquent, si le CRD ne possède pas de domaine pouvant initier la multimérisation, son effet sur les ostéoblastes serait bloqué et elle ne devrait pas modifier la production d'OC. Comme l'expression de l'OC diminuait en présence de CRD, soit le CRD pouvait se dimériser et agir sur les ostéoblastes, soit le CRD seul était responsable de l'effet sur les ostéoblastes. Pour tester notre hypothèse, la capacité du CRD à former des multimères fut évaluée. Un essai de pontage covalent a confirmé que la gal-3 peut se dimériser en absence et en présence d'un agent de pontage. La même chose fut observée pour le CRD qui, même en absence de l'agent de pontage, pouvait former des multimères. Selon leur poids, les multimères du CRD semblent être des tétramères. En l'absence du domaine N-terminal, il est possible que le CRD se multimérise via le domaine His-Tag de la protéine recombinante, qui comprend une répétition de 6 histidines. La digestion de His-Tag généra

le dCRD, qui ne présentait aucune dimérisation en absence de l'agent de pontage, contrairement à la CRD, ce qui confirme le rôle de His-Tag dans la multimérisation de cette protéine. Lorsque stimulés avec le dCRD, les ostéoblastes ne montrèrent aucune différence quant à leur expression d'OC. Par conséquent, la gal-3 extracellulaire doit se multimériser pour ensuite se lier à son récepteur à la surface des ostéoblastes, probablement via son CRD, pour engendrer une modification de l'expression de l'OC.

Comme il a déjà été démontré que les lipopolysaccharides (LPS) peuvent réduire l'expression d'OC par les ostéoblastes (*Kadono et al., 1999*) et que ces derniers peuvent se lier à deux sites sur la gal-3, la spécificité de la gal-3 quant à l'effet observé chez nos ostéoblastes fut étudiée. Dans le cas où la gal-3 serait liée à des LPS, il serait possible qu'elle initie l'inflammation plus facilement, d'où l'importance de s'assurer de l'absence de LPS dans la préparation de la protéine. Comme l'effet d'inhibition de l'OC est toujours présent suite à une stimulation avec la gal-3 commerciale sans LPS, les LPS qui auraient pu accidentellement contaminer la solution de gal-3 recombinante ne sont pas à la source de cet effet. Toutefois, les LPS ont réduit l'expression de l'OC par les ostéoblastes, tel que précédemment démontré. Comme la dCRD n'avait pas démontré d'inhibition de l'OC, nous avons supposé qu'elle ne contenant pas de LPS en son site de liaison C-terminal. De plus, cette absence d'inhibition confirme le rôle essentiel de la dimérisation de la gal-3 dans l'initiation de son effet sur les ostéoblastes OA.

Selon notre hypothèse, une phase inflammatoire initiée lors de l'OA pourrait favoriser la sécrétion de la gal-3 par les macrophages au niveau du pannus. Comme les cellules de la membrane synoviale peuvent aussi sécréter différentes cytokines et MMPs suite à la phagocytose de fragments de cartilage (*Klippel et al., 2001*), il serait possible qu'un tel processus soit impliqué dans l'activation des macrophages, l'initiation d'une phase inflammatoire et la sécrétion subséquente de la gal-3. Bien que la concentration de la gal-3 dans le fluide synovial mesurée par *Ohshima et al. (2003)* soit légèrement plus élevée que la normale, il serait possible que la sécrétion locale de la gal-3 crée de fortes concentrations de cette dernière au niveau du pannus. La gal-3 extracellulaire pourrait agir localement sur les chondrocytes et ostéoblastes pour favoriser la dégradation du cartilage et par le fait

même le relarguage de la gal-3 contenue dans les chondrocytes, initiant ainsi un cercle vicieux. Récemment, nous avons mesuré la production de la gal-3 extracellulaire par la membrane synoviale en présence de LPS, qui agit pour initier des conditions inflammatoires. La sécrétion de la gal-3 suite à une stimulation avec du LPS a doublé comparativement au contrôle. Par conséquent, la membrane synoviale inflammée est capable d'augmenter sa sécrétion de la gal-3.

Précédemment, notre laboratoire a démontré que la gal-3 était exprimée à un niveau plus élevé chez les chondrocytes OA que les chondrocytes normaux. Les chondrocytes ont déjà démontré qu'ils pouvaient sécréter de la gal-3 (*Hale & Wuthier, 1987*) et il serait possible qu'un quelconque stimulus augmente cette sécrétion chez les patients OA. L'augmentation de la gal-3 dans le fluide synovial suite à une sécrétion par les chondrocytes s'ajouterait à cette présence au niveau du pannus pour induire des changements destructifs au niveau de l'articulation OA. Dans leur article, *Ohshima et al. (2003)* démontraient que la concentration de la gal-3 dans le fluide synovial des patients OA était légèrement plus élevée que la normale, alors que la gal-3 était présente à de très fortes concentrations chez les patients atteints de RA. Il est probable que les échantillons obtenus des patients OA ne représentent pas les conditions prenant place lors des phases inflammatoires OA, où il serait possible d'observer une plus grande production de la gal-3. De plus, *Smith et al.* ont démontré que chez les patients présentant un stade avancé d'OA, la production d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  pouvait rivaliser avec celle observée chez les patients OA. Dans de telles circonstances, soit chez ces patients OA de stade avancé, peut-être serait-il possible que la gal-3 soit exprimée elle aussi à des niveaux rivalisant ceux observés chez les patients RA.

Une fois en présence de la gal-3, les chondrocytes produiraient de l'ADAMTS-5 et de la MMP-3, alors que les ostéoblastes verraient leur phénotype se modifier pour augmenter leur ratio RANKL/OPG et diminuer leur expression d'OC par une voie dépendant en partie de PI3 kinase. Ces modifications favoriseraient la dégradation des structures de l'articulation, tel que vue chez les souris ayant reçu une injection de gal-3, et par le fait même la progression de la pathologie.

## **PERSPECTIVES**

Différentes expériences permettraient d'éclaircir le rôle de la gal-3 extracellulaire dans la pathologie de l'OA. Il serait possible de stimuler des ostéoblastes avec la gal-3 et le dCRD simultanément dans le but d'observer une compétition possible entre les deux molécules. Si, comme le veut notre théorie, la gal-3 se lie à des récepteurs en surface des ostéoblastes via son domaine CRD, la compétition entre la gal-3 et le dCRD serait visible par un renversement de la réduction de l'expression de l'OC initiée par la gal-3. Il serait aussi intéressant d'observer l'impact *in vivo* au niveau articulaire du CRD. Une injection intra-articulaire de dCRD, une fois comparée aux résultats obtenus suite à une injection intra-articulaire de la gal-3, permettrait de déterminer s'il y a une corrélation entre la modification de l'expression de facteurs ostéoblastiques (OC, RANKL, AP, OPG) et la dégradation encourue par l'articulation. Il serait aussi possible d'étudier les altérations encourues par le promoteur de l'OC suite à une stimulation avec gal-3. Pour ce faire, le promoteur de l'OC serait intégré dans un vecteur en amont d'un gène rapporteur, comme la luciférase. Ce vecteur serait transfecté dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome, comme la lignée MG-63, et par la suite dans des ostéoblastes OA humains. Une stimulation subséquente de ces cellules transfectées avec la gal-3 ou le dCRD permettrait de déterminer si ces derniers répriment ou activent le promoteur de l'OC. Dans le but d'identifier les ligands de gal-3 à la surface des ostéoblastes, un « pull-down assay » pourrait être réalisé. Les protéines membranaires intégrales devraient être isolées à partir de cellules d'ostéoblastes OA. Comme la gal-3 contient une His-Tag, il serait possible de l'utiliser comme appât et ainsi identifier la ou les protéines de la fraction membranaire des ostéoblastes qui se lient à la gal-3. L'identité des protéines pourrait être confirmée par spectrométrie de masse ou électrophorèse bidirectionnelle. Comme nous n'avons étudié l'expression que de quelques gènes en présence de la gal-3, il serait intéressant d'observer la variation d'une multitude de gènes à l'aide d'un microarray effectué sur nos échantillons d'ostéoblastes et de chondrocytes humaines traités avec la gal-3 ou le dCRD.

## **CONCLUSION**

Nous avons démontré que la gal-3 extracellulaire génère des effets délétères *in vitro* chez les chondrocytes et les ostéoblastes OA et entraîne aussi une dégradation des structures articulaires *in vivo* chez la souris. La présence de la gal-3 induit la production d'enzymes destructrices des protéoglycanes, soit ADAMTS-5 et MMP-3, par les chondrocytes. De plus, elle modifie le phénotype des ostéoblastes en réduisant l'expression de l'OC et en modifiant le ratio RANKL/OPG. Ces changements pourraient favoriser la destruction des tissus de l'articulation lors de phases inflammatoires. De plus, la dimérisation de la gal-3 semble essentielle pour générer l'effet délétère sur les ostéoblastes. Bien que la gal-3 ait été détectée au niveau du pannus des patients OA, le stimulus qui induit sa production est toujours inconnu. Comme les macrophages de la membrane synoviale peuvent sécréter de la gal-3, il serait possible qu'une activation de ces derniers par différents cytokines lors des phases inflammatoires puisse initier la sécrétion de cette dernière. De plus, le récepteur de la gal-3 extracellulaire, responsable de la transmission du signal entraînant les changements délétères, n'a pas été identifié. Comme la gal-3 possède une panoplie de ligands, les candidats potentiels sont nombreux. Toutefois, comme l'activation du récepteur intégrine  $\beta 1$  a démontré que ce dernier peut réduire l'expression de l'OC initiée par la vitD<sub>3</sub>. De plus, il est connu que l'intégrine  $\beta 1$  peut se lier à la gal-3. Il serait intéressant de vérifier le rôle de ce récepteur dans la réduction de l'OC engendrée par la gal-3 et l'importance du pontage des récepteurs dans leur activation.

## RÉFÉRENCES

### A

---

Agrwal N, Sun Q, Wang SY, Wang JL. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem.* 1993; **268**: 14932-14939.

Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HRC et Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of the Bcl-2 family. *Cancer Res* 1997; **57**: 5272-5276.

Antoniades L, MacGregor AJ, Matson M. et Spector TD. A cotwin study of the relationship between hip osteoarthritis and bone mineral density. *Arthritis Rheumatism.* 2000; **43**: 1450-1455.

Aubin JE, Gupta AK, Bhargava U et Turksen K. Expression and regulation of galectin-3 in rat osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 1996; **169**: 468-480.

### B

---

Bartel DL, Bicknell VL, Ithaca MS et Wright TM. The effect of conformity. Thickness and material on stresses in ultra-high molecular weight components for total joint replacement. *J Bone Joint Surg.* 1986; **70** (A): 1041-1051.

Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R et Wells G. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; **2**:CD005328.

Billingham MEJ, Meijers MHM, Mahwinney B et Malcolm A. Spontaneous osteoarthritis in guinea pigs: cartilage degeneration is preceded by loss of subchondral trabecular bone. *J Rheumatol.* 1996; (**Suppl 1**): 104.

Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionesc M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekkman O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H et Poole A. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritis articular cartilage. *J Clin Invest.* 1997; **99**: 1534-1545.

Blanco FJ, Guitian R, Vasquez-Martul E, de Toro FJ et Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998; **41**: 284-289.

Boegard TL, Rudling O, Petersson IF et Jonsson K. Magnetic resonance imaging of the knee in chronic knee pain. A 2-year follow-up. *Osteoarthritis Cart.* 2001; **9**: 473-480.

Brennan PM, Chantry D, Jackson A, Maini R et Feldmann M. Inhibitory effect of TNF $\alpha$  antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1989; **i**: 244-247.

Bresalier RS, Mazurek N, Sternberg LR, Byrd J C, Yunker C K, Nangia-Makker P et Raz A. Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin-3. *Gastroenterology* 1998; **115**: 287-296.

Burr DB et Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: quantitative and microscopic evidence. *Microscopy Res Tech.* 1997; **37**: 343-357.

## C

---

Cecchinelli B, Lavra L, Rinaldo C, Iacovelli S, Gurtner A, Gasbarri A, Ulivieri A, Del Prete F, Trovato M, Piaggio G, Bartolazzi A, Soddu S et Sciacchitano S. Repression of antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2006; **26**: 4746-4757.

Colnot C, Sidhu SS, Balsamin N et Poirier F. Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin-3 null mutant bone. *Dev Biol.* 2001; **229**: 203-214.

Colnot C, Sidhu SS, Poirier F et Balmain N. Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of feta land neonatal mice. *Cell Mol Biol.* 1999; **45**: 1191-1202.

Croft P, Coggon D, Cruddas M, Cooper C. Osteoarthritis of the hip: an occupational disease in farmers. *BMJ.* 1992; **6837**: 1269-1272.

## D

---

Dagher SF, Wang JL et Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *PNAS.* 1995; **92**: 1213-1217.

Davidson PJ, Li SY, Lohse AG, Vandergaast R, Verde E, Pearson A, Patterson RJ, Wang JL et Arnoys EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and the cytoplasm. I. Conditions and signal for nuclear import. *Glycobiology*. 2006; **16**: 602-611.

Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, Barclay JD et Segal MR. Correlates of knee pain with and without radiographic knee osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1992; **19**: 1943-1949.

DeGroot J, Verzijl N, Bank RA, Lafeber FP, Bijlsma JW et Tekoppele JM. Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation. *Arth Rheum*. 1999; **42**: 1003-1009.

Demissie S, Cupples LA, Myers R, Aliabadi P, Levy D et Felson DT. Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: the Framingham study. *Arthritis Rheumatism*. 2002; **46**: 946- 952.

Dieppe PA et Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet*. 2005; **365**: 965-973.

Dougados M. Why and how to use NSAIDs in osteoarthritis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; **47**, Supplement: S49-54.

Dougados M, Gueguen A, Nguyen M, Thiesce A, Listrat V, Jacob L, Nakache JP, Gabriel KR, Lequesne M et Amor B. Longitudinal radiologic evaluation of osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*. 1992; **19**: 378-383.

Dumic J, Dabelic S et Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; **1760**: 616-635.

## E

---

Elas-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositol-3 kinase activity. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 34922-34930.

## F

---

Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM et Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis: a Framingham study. *Ann Intern Med*. 1988; **109**: 18-24.

Felson DT et Zhang YQ. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum*. 1998; **41**: 1343-1355.



Fernández GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gómez SA, Bompadre MB, Isturiz MA, Rabinovich GA et Palermo MS. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology*. 2005; **15**: 519-527.

Fowles D, Colnot C, Ripoche MA et Poirier F. Galectine-3 is expressed in the notochord, developing bones and skin of the posimplantation mouse embryo. *Dev Dyn*. 1995; **203**: 241-251.

Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HRC, Hogan V, Inohara H, Kagawa S et Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T cell apoptosis. *Cancer Res*. 2003; **63**: 8302-8311.

Furtak V, Hatcher F et Ochieng J. Galectine-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biophys Biochem Res Commun*. 2001; **289**: 845-850.

## G

---

Gahunia HK, Lemaire C, Babyn PS, Cross AR, Kessler MJ et Pritzker KPH. Osteoarthritis in rhesus macaques knee joint: quantitative magnetic resonance imaging tissue characterization of articular cartilage. *J Rheumatol*. 1995; **22**: 1747-1756.

Garner SE, Fidan DD, Frankish RR et Maxwell LJ. Rofecoxib for osteoarthritis. [Systematic Review] Cochrane Musculoskeletal Group. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006, **4**.

Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH et Cao T. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis & Rheumatism*. 2006; **55**: 493-500.

Gil CD, La M, Perretti M, Oliani SM. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin-1, galectin-1 and galectin-3. *Cell Biol Int*. 2006; **30**: 338-344.

Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS et Raz A. The NH<sub>2</sub> terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and function in cancer cells. *Cancer Res*. 1999; **59**: 6239-6245.

Gordon GW, Villanueva T, Schumacher HR et Gohel V. Autopsy study correlating degree of osteoarthritis and evidence of articular cartilage calcification. *J Rheumatol*. 1984; **11**: 681-686.

Guévremont M, Martel-Pelletier J, Boileau C, Liu FT, Richard M, Fernandes JC, Pelletier JP et Reboul P. Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes : a potential substrate for collagenase-3. *Ann Rheum Dis*. 2004 ; **63** : 636-643.

## H

---

Hale JE, Wuthier RE. The mechanism of matrix vesicle formation. *J Biol Chem*. 1987; **262**: 1916-1925.

Haq I, Murphy E et Dacre J. Osteoarthritis. *Postgrad Med J*. 2003 ; **79** :377-383.

Harjacek M, Diaz-Cano S, De Miguel M, Wolfe H, Maldonado CA et Rabinovich GA. Expression of galectin-1 and -3 correlates with defective monocuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2001; **28**: 1914-1922.

Hirabayashi J et Kasai K. The family of metazoan metal-dependant beta-galactoside-binding lectine : structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993; **3**: 297-304.

Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C et Poole AR. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest*. 1994; **93**: 1722-1732.

Huflejt ME, Turck CW, Lindsted R, Barondes SH et Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem*. 1993; **268**: 26712-26718.

Hughes RC. Secretion of the galactin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1999; **1473**: 172-185.

Hunter DJ et Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ* 2006; **332** :639-642.

Hwang WS, Li B., Jin LH, Ngo K, Schachar NS et Hughes GNF. Collagen fibril structure of normal aging, and osteoarthritic cartilage. *J Pathol*. 1992 ; **167** : 425-433.

## J

---

Jawad, ASM. Analgesics and osteoarthritis : are treatment guidelines reflected in clinical practice? *American Journal of Therapeutics*. 2005; **12**: 98-103.

Jeng KC, Frigeri LG et Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol Letters*. 1994; **42** : 113-116.

Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff M, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein activated in T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; **69** : 555-564.

## K

---

Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N et Nagata T. Inhibition of osteoblastic differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1999; **6** : 2841-2846.

Kadrofske MM, Openo KP et Wang JL. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys*. 1998; **349**: 7-20.

Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of Runt-Related Transcription Factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*. 2006; **54**: 2462-2470.

Kim HK, Moran ME et Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*. 1991; **73**: 1301-1305.

Kivimäki J, Riihimäki H, Hanninen K. Knee disorder in carpet and floor layers and painters. *Scand J Work Environ Health*. 1992; **5**: 310-316.

Kiwaki K, Novak CM, Hsu DK, Liu FT et Levine JA. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. *Obesity*. 2007; **15**: 32-38.

Knäuper VC, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM et Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to activate enzyme. *J Biol Chem*. 1996; **271**: 17124-17131.

## L

---

Lane NE, Buckwalter JA. Exercise: a cause of osteoarthritis? *Rheum Dis Clin N.A.* 1993; **19**: 617-633.

Lee TL, Lin YC, Mochitate K et Grinnell F. Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, aneins II and VI and  $\beta$ 1-integrin receptors. *J Cell Sci.* 1993; **105**: 167-177.

Li SY, Davidson PJ, Lin NY, Patterson RJ, Wang JL et Arnoys EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. II. Identification of the signal for nuclear export. *Glycobiology.* 2006; **16**: 612-622.

Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY et Henderson,WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol.* 1995; **147**: 1016-1028.

## M

---

Mansell JP et Bailey AJ. Abnormal cancellous bone metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 1998; **101**: 1596-603.

Martin TJ. Paracrine regulation of osteoclast formation and activity: Milestones in discovery. *J Musculoskel Neuron Interact.* 2004; **4**: 243-253.

Massa SM, Cooper DNW, Leffler H, Barondes S. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugates ligands with positive cooperativity. *Biochemistry.* 1993; **32**: 260-267.

Matsui H, Shimizu M, Tsuji H. Cartilage and subchondral bone interaction in osteoarthritis of human knee joint: a histological and histomorphometric study. *Microsc Res Tech.* 2004; **37**: 333-342.

Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A et Bresalier RS. Phosphorylation of the  $\beta$ -galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 36311-36315.

McCarthy AD, Ercheverry SB, Bruzonne L, Lettieri G, Barrio DA et Cortizo AM. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol.* 2001; **2**: 16.

Mehui B et Hughes RC. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin-3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *Journal of Cell Science.* 2007; **110**: 1169-1178.

Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolusaccharides via two independent sites. *J Immunol* 1996; **156**: 1572-1577.

Mitchell PH, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF et Hambor JE. Cloning, expression and type I collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1996; **97**: 761-768.

## N

---

Nakahara S, Oka N, Wang Y, Hogan V, Inohara H et Raz A. Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. *Cancer Res.* 2006; **66**: 9995-10006.

Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ et Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000; **156**: 899-909.

Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J et Sato S. Visualisation of galectin-3 oligomerisation on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol.* 2007; **282**: 1374-1383.

Nurminskaya M, Lisenmayer TF. Identification and characterisation of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. *Dev Dyn.* 1996; **206**: 260-271.

## O

---

Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu FT, Gay S et Neidhart M. Galectin-3 and its binding proteins in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; **48**: 2788-95.

Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M et Marth JD. Dietary and genetic control of glycosylated transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell.* 2005; **123**:1307-21.

Ochieng J, Leite-Browning, ML et Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biophys Res Commun.* 1998; **246**: 788-791.

Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochem Biophys Acta.* 1998; **1379**: 97-106.

Ochieng J, Vyacheslav F et Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate J.* 2004; **19**: 527-535.

Oshieng J, Warfield P, Green-Jarvis B, Fentie I. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *J Cell Biochem* 1999; **75**: 505-514.

## P

---

Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, Pandolfi M, Ledda L, Di Loreto C, Damante G, Tell G. Nuclear localisation of galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; **302**: 545-553.

Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM et Martel-Pelletier J. Synthesis of metalloproteinases and interleukin-6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an il-1 mediated process. *J Rheumatol*. 1995; **43** (Suppl.): 109-114.

Pritzker KPH. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis*. 1994; **53**: 406-420.

Punzi L, Oliviero F, Ramonda R, Sfriso P et Todesco S. Laboratory findings in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; **34**(6 Suppl 2):58-61

## R

---

Raimond J, Zimonjic DB, Mignon C, Mattei M, Popescu NC, Monsigny M et Legrand A. Mapping of the galectin-3 gene (LSGAL3) to human chromosome 14 at region 14q21-22. *Mamm genome*. 1997; **8**: 706-707.

Raz A, Zhu D, Hogan V, Shah N, Raz T, Karkash R, Pazerini G, et Carmi P. Evidence for the role of a 34-kDa galactoside binding lectin in transformation and metastasis. *Int J Cancer*. 1990; **46**: 871-877.

Raz. A, Pazerini G, Carmi P. Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res*. 1989; **49**: 3489-3493.

Revell PA, Pirie C, Amir G, Rashad S et Walker F. Metabolic activity in the calcified zone of cartilage : observation on tetracycline labeled articular cartilage un human osteoarthritic hips. *Rheumatol Int*. 1990; **10**: 143-147.

Ripamonti U, Duneas N, Van Den Heever B, Bosch C et Crooks J. Recombinant transforming growth factor-beta1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res*. 1997;**12** :1584-1595.

Riss D, Jin L, Qian X, Bayliss J, Scheithauer BW, Young WF Jr, Vidal S, Kovacs K, Raz A. et Lloyd RV. Differential expression galectin-3 in pituitary tumors. *Cancer Res* 2003; **63**: 2251-2255.

Roff CF, Wang JL. Endogenous lectine from cultured cells : isolation and characterisation of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1983; **258** (17): 10657- 10663.

Rogers JM et Dieppe PA. Ridges and grooves on the bony surfaces of osteoarthritic joints. *Osteoarthritis Cart.* 1993; **1**: 167-170.

## S

---

Sato S, Huges RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 1994; **269**: 4424-4430.

Schoeppner HL, Raz A, Ho SB et Bresalier RS. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer (Phila.)* 1995; **75**: 2818-2826.

Seetharaman S, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem.* 1998; **273**: 13047-13052.

Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A et Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005; **65**: 7292-7300.

Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, Kikuchi A, Kuwano H et Raz A. Implication of Galectin-3 in Wnt signalling. *Cancer Res.* 2005; **65**: 3535-3537.

Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A et Raz A. Galectin-3 as a novel binding partner of catenin. *Cancer Res.* 2004; **64**: 6363-6367.

Slemenda TD, Brandt KD, Heilman DK, Mazzuca S, Braunstein EM, Katz BP et Wolinsky FD. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med.* 1997; **127** : 97-104.

Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP et Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1997; **24**: 365-371.

Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M et Jamadar DA. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006; **54** : 2481-2487.

Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J et Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *Br Med J*. 1996; **312**: 940-944.

Stein JM et Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J*. 1991; **274**: 381-386.

Stewart A, Black A, Robins, SP et Dieppe PA. Bone density and bone turnover in patients with osteoarthritis and osteoporosis. *J Rheumatol*. 1999; **26**: 622-626.

Stock M, Schäfer H, Stricker S, Gross G, Mundlos S et Otto F. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx-2. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 17360-17367.

## T

---

Tsay YG, Lin NY, Voss PG, Patterson RJ et Wang JL. Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilised mouse 3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1999; **252**: 250-261.

## U

---

Umemoto K, Leffler H, Venot A, Valafar H, Prestegard JH. Conformational differences in liganded and unliganded states of galectin-3. *Biochemistry*. 2003; **42**: 3688-3695.

## V

---

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M et Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*. 2000; **113**: 377-381.

Van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, doi:10.1016/j.joca.2006.11.006 (e-pub avant publication)

Van Valburg AA, Wenting MJG, Beekman B, Te Koppele JM, Lafeber FPJG et Bijlsma JWW. Degenerated human articular cartilage at autopsy represents preclinical osteoarthritic cartilage: comparison with clinically defined osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol*. 1997; **24**: 358-364.



Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT et Cerami A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med.* 1995; **1**: 634-646.

## W

---

Wang L, Inohara H, Pienta KJ et Raz A. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; **217**: 292-303.

Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS et Nuckolls GH. Regulation of MMP-13 expression by Runx-2 and FGF-2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; **12**: 963-973.

Westacott CI, Webb CR, Warnock MG, Sims JV et Elson CJ. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum.* 1997; **40**:1282-1291.

Wieland HA, Michaelis M, Kirshbaum BJ et Rudolphi KA. Osteoarthritis- an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discovery.* 2005; **4**: 331-344.

## X

---

Xu XC, El-Naggar AK, et Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. *Am J Pathol.* 1995; **147**: 815-822.

## Y

---

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *PNAS* 1996; **93**: 6737-6742.

Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HFC et Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 6852-6857.

Yu F, Finley RL Jr, Raz A. et Kim HFC Galectin-3 translocates to the perinuclear membrane and inhibits cytochrome c release from the mitochondria: a role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 15819-15827.

**Z**

---

Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK et Papavassiliou AG. The bone specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 23934-23941.

Zhu WQ et Ochieng J. Rapid release of intracellular galectin-3 from breast carcinoma cells by fetuin. *Cancer Res.* 2001; **61**: 1869-1873.

Zuberi RI, Frigeri LG et Liu FT. Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon BP, an IgE-binding endogenous lectin. *Cell Immunol.* 1994; **156**: 1-12.

## LIVRES

**B**

---

**Brandt, Doherty, Lohmander.** "Pathology of osteoarthritis" dans *Osteoarthritis*, 2<sup>e</sup> édition, Oxford University Press, New York, 2003, p.49-58.

**Brody, Larner, Minneman.** "Pain and inflammation control with nonsteroidal antiinflammatory drugs" dans *Human pharmacology: molecular to clinical*. 3<sup>e</sup> édition, Mosby, St. Louis, 1998, p. 409-420.

**G**

---

**Gartner et Hiatt.** "Cartilage and bone" dans *Color atlas of histology*, 3<sup>e</sup> édition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie, 2000, p.64-88.

**H**

---

**Harris et Keller.** "Composition of bone matrix" dans *Keller's textbook of rheumatology*, 7<sup>e</sup> édition, Saunders, Philadelphie, 2005, URL:[das/book/0/view/1257/707.html/top](http://das/book/0/view/1257/707.html/top) sur [www.mdconsult.com](http://www.mdconsult.com).

**I**

---

**Isenberg et al.** "Osteoarthritis" dans *Oxford textbook of rheumatology*, 3<sup>e</sup> édition, Oxford University Press, New York, 2004, p.959-983.

**J**

---

**Junqueira et Carneiro.** "Bone" dans *Basic Histology: text and atlas*. 10<sup>e</sup> édition, McGraw Hill, New York, 2003, p. 141-159.

## K

---

**Klippel, Crofford, Stone, Weyand.** "Osteoarthritis: A. Epidemiology, pathology and pathogenesis" dans *Primer on the rheumatic diseases*, 12e édition, Arthritis Foundation, Atlanta, 2001, p.285-297.

## M

---

**Moskowitz, Howell, Altman, Buckwater et Goldberg.** "Etiopathogenesis of osteoarthritis" dans *Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management*. 3<sup>e</sup> édition, WB Saunders Company, Philadelphia, 2001, p. 29-47.

## R

---

**Rang, Dale, Ritter, Moore.** "Bone metabolism" dans *Pharmacology*, 5<sup>e</sup> édition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003, p. 446-454.

**Reginster, Pelletier, Martel-Pelletier, Henrotin.** "Structure and function of normal human adult articular cartilage" dans *Osteoarthritis: clinical and experimental aspects*, Springer, Berlin, 1999, p.1-19.

## V

---

**Vander, Sherman, Luciano.** "Calcium regulation" dans *Human physiology: the mechanisms of body function*. 8<sup>e</sup> édition, McGraw Hill, New York, 2001, p. 538-542.

**Déclaration de l'étudiante**

Je déclare avoir fait la majorité des manipulations incluses dans ce manuscrit. Je tiens à remercier Dr. Christelle Boileau pour les expériences in vivo d'injection intra-articulaire de la galectine-3, Mélanie Guévremont pour la stimulations de chondrocytes OA avec la galectine-3 et Maxime Dussault-Laurendeau pour les essais de dimérisation du CRD en présence de BS<sup>3</sup>.